

## 紫外線高感受性症候群責任因子 UVSSA の分子機能解析

荻 朋 男<sup>1,2</sup>, 中 沢 由 華<sup>1,2</sup>, 佐々木 健作<sup>1,2</sup>, 郭 朝 万<sup>1,2</sup>,  
吉浦 孝一郎<sup>3</sup>, 宇谷 厚志<sup>4</sup>, 永山 雄二<sup>2</sup>

ヌクレオチド除去修復機構 (NER) は、DNA 損傷修復の主要なシステムの一つであり、その遺伝的な欠損は、ヒトでは発がんや老化を伴う重篤な疾患の原因となる。本研究では今年、NER が欠損した遺伝性皮膚疾患である、紫外線高感受性症候群 (UV<sup>s</sup>S) の新規責任遺伝子として UVSSA (*KIAA1530*) を同定した。UV<sup>s</sup>S は NER のサブパスイである転写共役 NER (TC-NER) が完全に欠損しているものの、その臨床像は極めて軽微 (日光過敏症や、しみ/そばかす等軽度の皮膚症状) であり、皮膚がんや老化症状が見られないという特徴をもつ。分子機能解析の結果、光 DNA 損傷箇所での停止した RNA ポリメラーゼのユビキチン化修飾と DNA 修復反応の進行に UVSSA タンパク質が必須であり、UV<sup>s</sup>S 患者細胞では、紫外線照射により DNA 修復が阻害され RNA ポリメラーゼの分解が促進されることが明らかにされた。

## 1. はじめに

紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UV<sup>s</sup>S, OMIM: 614632)<sup>1,2</sup> は、軽微な日光過敏を伴う遺伝性疾患の

鑑別診断の結果、1995年に熊本大学の山泉克らにより UV<sup>s</sup>S と命名され<sup>1)</sup>、後年、1981年に本邦で報告された症例が最初の患者であると確認された<sup>3)</sup>。UV<sup>s</sup>S 患者では、幼少時から日焼けや、恒常的な日光曝露部位へのシミ、そばかす (色素斑) の増加、ドライスキン、毛細血管の拡張等が見られる。常染色体劣性の遺伝性疾患であり、主に太陽光中の紫外線 (ultra violet: UV) により生じる、シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) や、6-4 光産物 (6-4PP) 等の光 DNA 損傷の除去修復を行うことができないために日光過敏症を発症する。DNA 修復欠損性の遺伝性疾患のうち、光 DNA 損傷の修復が欠損するものに、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) やコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) が知られている<sup>4)</sup>。XP や CS では主に、光 DNA 損傷をはじめ、環境変異源であるベンゾ[a]ピレン (BaP) や、食品の加工過程で生じるアセチルアミノフルオレン (AAF) などの塩基に共有結合した付加型の DNA 損傷など、DNA の立体構造変化を伴う損傷塩基を含む近傍のヌクレオチドを除去して修復する、ヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair: NER) が欠損している<sup>5)</sup>。NER は DNA 修復機構の中でも最も汎用性が高い主要な修復システムであり、XP や CS では NER の機能喪失をもたらす疾患原因遺伝子 (*XPA-XPG/ERCC1/TTDA/CSA/*

<sup>1</sup>長崎大学がん・ゲノム不安定性研究拠点 (NRGIC), <sup>2</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設分子医学研究分野 (〒852-8523 長崎市坂本 1-12-4 長崎大学医学部附属原爆後障害医療研究施設 原研分子 (R213)), <sup>3</sup>同人類遺伝学研究分野, <sup>4</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学研究分野

Molecular cloning and characterisation of UVSSA, the responsible gene for UV-sensitive syndrome Tomoo Ogi<sup>1,2</sup>, Yuka Nakazawa<sup>1,2</sup>, Kensaku Sasaki<sup>1,2</sup>, Chaowan Guo<sup>1,2</sup>, Koh-ichiro Yoshiura<sup>3</sup>, Atsushi Utani<sup>4</sup>, and Yuji Nagayama<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Nagasaki University Research Centre for Genomic Instability and Carcinogenesis (NRGIC), <sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences (Department of Molecular Medicine (R213), Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University, 1-12-4, Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki 852-8523, Japan), <sup>3</sup>Department of Human Genetics, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, <sup>4</sup>Department of Dermatology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences)

CSB) と、その変異の種類に応じて、幅広い臨床スペクトラムを示す。特に、XP では皮膚がんを伴う皮膚症状を特徴とする。また、CS では DNA 修復欠損の他に、細胞の正常な遺伝子転写も阻害されるため、日光過敏の他にも、各種神経症状、精神遅滞、眼症状、発達障害等の全身性の重篤な病態を示すと考えられている。これに対して、UV<sup>s</sup> の病態は極めて軽微であり、日光過敏症とそれに起因する皮膚の軽微な形態変化に限定され、XP や CS で観察される、皮膚がんや全身性の重篤な症状は示さない<sup>1,2)</sup>。

UV<sup>s</sup> には疾患責任遺伝子に相当する UV<sup>s</sup>/CS-A, UV<sup>s</sup>/CS-B, UV<sup>s</sup>-A の三つの相補性群が知られており、日本人 6 症例を含み世界中でこれまでに少なくとも 8 症例が報告されている<sup>3,6-9)</sup>。健常な日本人の集団中に見られる UV<sup>s</sup> 責任変異 (UV<sup>s</sup>-A による) のアリル頻度から計算された疾患の推定発生頻度は数十万人に 1 人であるが<sup>10)</sup>、通常 UV<sup>s</sup> 疑いの患者が、皮膚科を受診した際に見られる臨床所見は軽度の光線過敏のみであり、遺伝子検査、細胞の DNA 修復試験等による確定診断に至っていない潜在的な症例、また CSA/CSB/UVSSA 以外にも未知の責任遺伝子/責任変異が存在する可能性が考えられる。特に、皮膚の病態が類似する、皮膚がんの発症が見られない軽度の XP においては、臨床的には UV<sup>s</sup> との鑑別診断が困難である。このため、軽症 XP、あるいは XP との診断に至らない軽度 XP のうちの一定数は UV<sup>s</sup> の原因遺伝子に変異

を有する可能性が示唆される。実際に、既知の UV<sup>s</sup> の 2 症例は、当初は XP との診断であったが、後に UV<sup>s</sup> 責任変異が同定されている<sup>10,11)</sup>。

XP, CS, UV<sup>s</sup> で欠損が見られる NER 機構は、DNA 損傷の認識の機序によって、二つのパスウェイに分類される (図 1)。紫外線などに由来する DNA 損傷は、ゲノム DNA 全域にわたって存在するが、これらを修復するのが全ゲノム修復 (global genome NER: GG-NER)<sup>12)</sup> である。GG-NER では、XP の原因遺伝子の一つである XPE がコードする DDB2 タンパク質を含む UV-DDB 複合体、および別の XP 原因因子である XPC タンパク質複合体らによって紫外線 DNA 損傷が認識される。これに対して、もう一つのパスウェイは、遺伝情報のメッセンジャー RNA (mRNA) への転写が盛んな領域を効率的に修復する、転写共役修復 (transcription-coupled NER: TC-NER) である<sup>13)</sup>。TC-NER では、DNA 損傷箇所まで停止した転写中のリン酸化 RNA ポリメラーゼ II (RNA polII) を、TC-NER に特有の CSA 責任因子である CSA 複合体/CSB 複合体が認識することで修復反応が開始される。RNA polII は、損傷箇所から一次的に解離され (バックトラッキング)、その後 DNA 損傷の除去、転写の再開が起こると考えられている。GG-NER と TC-NER では損傷認識過程が異なるが、その後は、TFIIH 複合体による損傷塩基近傍の巻き戻しと、XPF/ERCC1 複合体 (5'), XPG (3') の二つのエンドヌクレアー

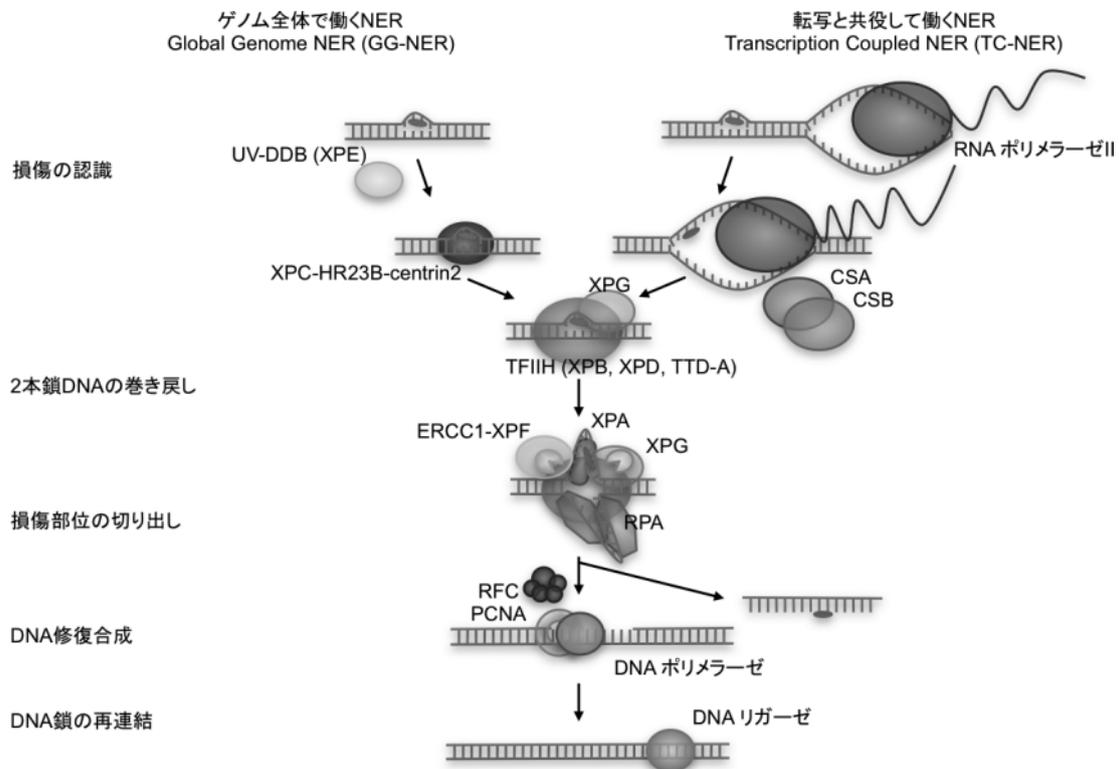


図1 ヌクレオチド除去修復機構 (GG-NER/TC-NER) の概略

ゼによる損傷の除去, 修復DNA合成, ニックの連結の順に一連の修復反応が進行する。

UV<sup>S</sup>では, CSと同様にTC-NER機構による光DNA損傷の修復機能が完全に欠損しており, 細胞レベルではCSと同一の表現型を示す。UV<sup>S</sup>とCSの患者由来の培養細胞においては, TC-NER活性の指標である, 紫外線曝露後のRNA合成回復能 (recovery of RNA synthesis: RRS) の低下と, 紫外線に対しての高感受性が観察される<sup>1,2)</sup>。TC-NER機構はTFIIHによる細胞の転写制御と, DNA損傷時のmRNA転写の迅速な再開に必須である。このため, TC-NER欠損性の疾患はCSをはじめとして, 全身性の重篤な病態を示す。しかしながら, UV<sup>S</sup>患者では軽微な臨床像を示すのみであり, 両者の矛盾は興味深く, UV<sup>S</sup>責任因子の機能解析はTC-NER分子機構とその欠損による病態の説明に大きく寄与すると考えられ, 責任遺伝子のクローニングが待ち望まれていた。

## 2. UV<sup>S</sup>責任遺伝子のクローニング

UV<sup>S</sup>の既知の三つの相補性群のうち, 2004年に最初の遺伝子変異が大阪大学の田中亀代次らにより同定された。この変異は興味深いことに, CS責任遺伝子の一つである, *CSB* (*ERCC6*) のN末端コード領域に存在し, *CSB*タンパク質の発現が完全に欠損するホモのストップゲイン変異 (p.Arg77\*: 77番目のアルギニンが終止コドンに変化する, 以下同様) であった<sup>14)</sup>。その後, イタリア国立研究所CNRのMiria Stefaniniらが, もう一つのCS責任遺伝子である, *CSA* (*ERCC8*) のC末端コード領域にホモのミスセンス変異 (p.Trp361Cys) を同定した<sup>15)</sup>。UV<sup>S</sup>には, この二つの相補性群以外にも, 細胞融合試験により別の相補性群であるUV<sup>S</sup>-Aが知られていた。この責任遺伝子*UVSSA* (*KIAA1530*) は, 2012年に我々の研究グループを含む, オランダと日本の3グループにより同定された<sup>10,16,17)</sup>。なお, 現在までに*UVSSA*遺伝子に変異を持つCS症例の報告はない。

UV<sup>S</sup>-Aの責任変異同定にあたり, 我々の研究グループでは, 血縁関係にない, 日本人2症例 (Kps3とXP24KO) についてゲノム解析を実施した (図2)。各症例由来細胞より調製したゲノムDNAサンプルは, アジレント・テクノロジー社のSureSelectターゲットエンリッチメントシステム (human all exon 44M hg18) を使用して, 全エクソン領域の濃縮を行った。濃縮サンプルはPCRによる増幅の後, イルミナ社の次世代ゲノムシーケンサーGAIIxシステムにより, 各サンプルについて1レーン, 75bp, ペアエンドリードの条件で配列解析を実施した。両サンプルともに, クオリティチェックを通過したリード数がトータル約7,000万リード, 全塩基配列がおよそ5Gbpほど得られ, このうち97%がヒトゲノム配列にマッピングされた。

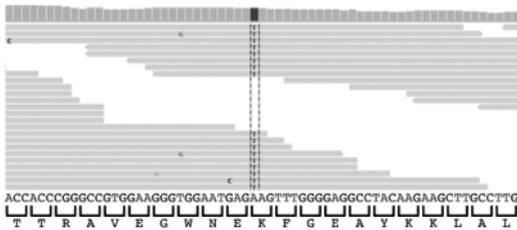
また, 全リードのうち90%が一義的にマッピングされ, 最終的には両サンプルともに, ターゲット領域に約2Gbpがマッピングされた。全コード領域及び, 各エクソン-イントロンの境界領域内に存在する1塩基置換変異 (single nucleotide variants: SNVs) と挿入置換変異 (insertion/deletions: indels) の総数は, およそ9~12万箇所であった。これらのSNVs/indelsについて, アミノ酸置換置換変異やmRNAスプライシング異常を引き起こすなどの遺伝子機能の喪失が予測されるもののうち, バブリック及びインハウスのデータベースに登録がないものをフィルターにより選択したところ, 各サンプルについて約250の変異がフィルターをパスした。これらの疾患候補となりうる変異のうち, 劣性遺伝病のモデルに合致するケースは, 両サンプルともに約20件が該当した。これらの遺伝子について両サンプル間でのオーバーラップを調べたところ, ただ一つの遺伝子*KIAA1530*が見つかった。*KIAA1530*遺伝子は機能未知のタンパク質をコードしており, 一連の機能解析の後に, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) との協議の上で, *UVSSA* (UV-specific scaffold protein A: *UVSSA*) と命名された。

*UVSSA*遺伝子は, 4番染色体4p16.3にマップされ, 全長41kbの領域に14個のエクソンが含まれ, 709個のアミノ酸からなるタンパク質をコードしていた。*UVSSA*-A相補性群に含まれる4症例について, Sangerシーケンシングにより*UVSSA*遺伝子の全コード領域の配列解析を行った。その結果, 日本人2家系3症例 (Kps3, Kps2, XP24KO) について, エクソン3にエキソーム解析で同定されたホモのp.Lys123\*変異が確認され, またイスラエルの1症例UV<sup>S</sup>S24TAについて, エクソン2にホモのp.Ile31Phefs\*9 (31番目のイソロイシンがフェニルアラニンに変化し, その9残基後でフレームシフトによる終止コドンが発生する) 変異が同定された。これらのUV<sup>S</sup>-A症例由来細胞について, 細胞抽出液のウェスタンブロットによる*UVSSA*タンパク質発現解析を行ったところ, 健常人由来細胞では, 約80kDa近傍に*UVSSA*タンパク質由来のバンドが確認され, UV<sup>S</sup>-A症例由来細胞では発現が認められなかった。さらに, XP24KOと同一相補性群として報告のあった, 日本人症例由来のXP70TOについて配列解析を行ったところ, エクソン2にホモのp.Cys32Arg変異が確認された。XP70TOでは低レベルで*UVSSA*タンパク質の発現が確認された。

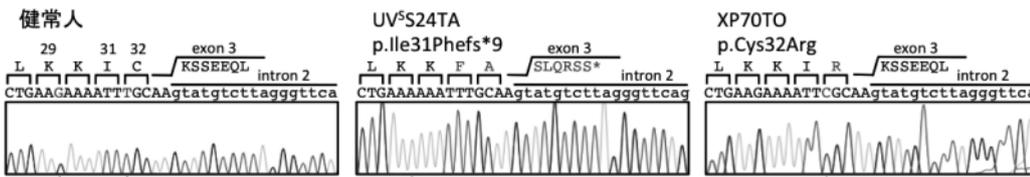
互いに血縁関係にない4家系のUV<sup>S</sup>症例について, 同一遺伝子に異なるストップゲイン/フレームシフト変異が確認されたことから, 引き続き細胞レベルでの検証を実施した (図3)。これまでの報告で, UV<sup>S</sup>症例由来細胞ではGG-NER活性は正常であるが, TC-NERが完全に欠損していることが示されている。このため, UV<sup>S</sup>責任因子の評

	Kps3	XP24KO
リファレンスと異なる配列	91,334	114,293
アミノ酸置換等のタンパク質構造変化を伴う変異	7,488	7,211
データベースSNP131、1000人ゲノム、長崎大学原研遺伝のデータベースに登録のない変異 (新規の変異)	263	243
責任遺伝子候補	1 ( <i>KIAA1530/UVSSA</i> )	

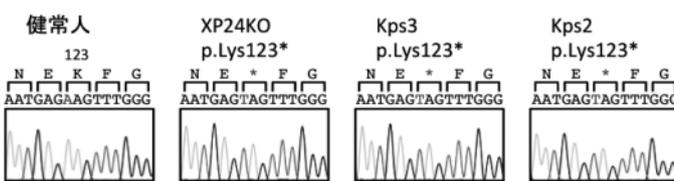
**b** Kps3 *UVSSA:c.367A>T*



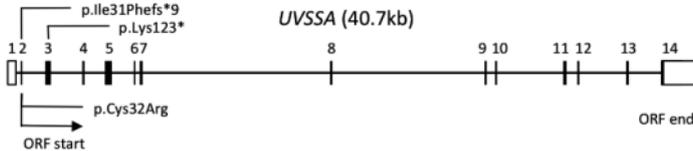
**c**



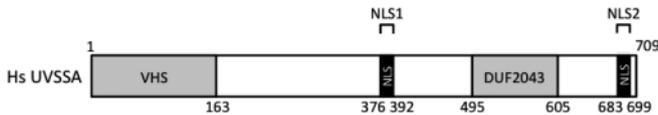
**d**



**e**



**f**



**g**

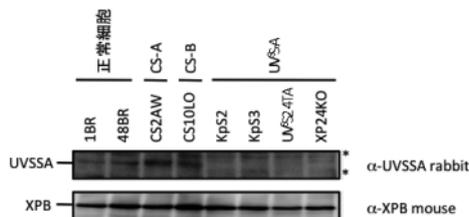


図2 UV<sup>S</sup>-A 責任遺伝子 *UVSSA* のクローニング

(a) 日本人2症例 Kps3 と XP24KO の全エクソーム解析による *UVSSA* 遺伝子の直接決定, (b) 次世代ゲノムシーケンサーでのゲノム解析概要. Kps3 ゲノム中での *UVSSA* 変異を含むリードのマッピングの様子, (c) Sanger シーケンシングによる UV<sup>S</sup>24TA と XP70TO 症例中の *UVSSA* 責任変異の同定, (d) Sanger シーケンシングによる Kps3/Kps2, XP24KO 症例中の *UVSSA* 責任変異の同定, (e) *UVSSA* ゲノム構造の概略, (f) *UVSSA* タンパク質の構造概略, (g) 健康人および UV<sup>S</sup>-A 症例由来細胞中での *UVSSA* タンパク質の発現.

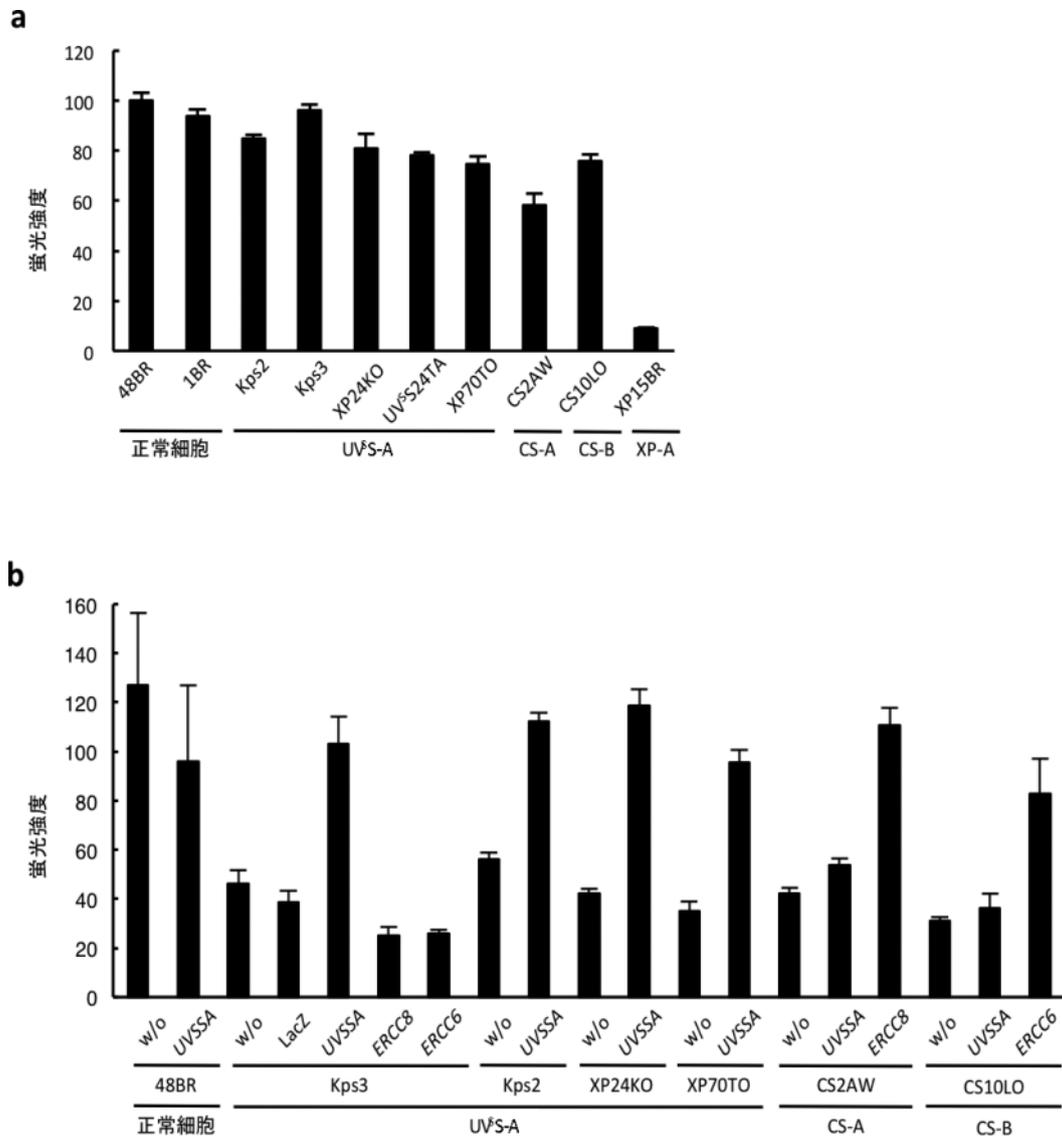


図3 紫外線照射後のRNA合成回復にはUVSSA遺伝子が必要である

(a) UV<sup>S</sup>-A 症例由来細胞は健康人由来細胞と同レベルのGG-NER活性を示す。(b) UV<sup>S</sup>-A 症例由来細胞はTC-NER活性が欠損している。UVSSA遺伝子を発現するレンチウイルスを感染させることで正常レベルまでTC-NER活性が回復する。

価にあたり、正常なUVSSA遺伝子をコードするcDNAを発現するレンチウイルスを作製し、これをUV<sup>S</sup>-A症例由来細胞に感染させた後、RRS活性の回復の度合いを評価することでの検証が可能である。ウイルス感染48時間後に、細胞に10 J/m<sup>2</sup>の紫外線を照射し、その12時間後のRNA合成回復能を検討した。実験には、我々の研究室で開発した、迅速簡便なDNA修復活性の測定技術を用いた<sup>10, 18, 19</sup>。この技術は、これまで放射性同位元素を用いて実施されていたDNA修復合成試験(unscheduled DNA synthesis: UDS)と、RNA合成回復試験(RRS)について、UDSの評価には、DNA前駆体としてチミジン誘導体であるエチニルデオキシウリジン(ethynyldeoxyuridine: EdU)を、RRSの評価には、RNA前駆体であるウリジンの誘導体と

してエチニルウリジン(ethynyluridine: EU)を利用し、その取り込みと、Clickケミストリー(米スクリプス研究所のBarry Sharplesが提唱する、フイスゲン反応を利用した銅触媒を用いるアルキン/アジド付加環化反応による簡単かつ安定な結合導入法)によるEdU, EUと蛍光Alexaアジドとのカップリング反応、さらに自動細胞イメージング装置を用いた多検体同時処理を可能としたものである。すべてのUV<sup>S</sup>症例由来細胞において、野生型UVSSAの全長cDNAをコードするウイルスを感染させることで、RRSの100%回復が確認された。この際に、CS症例由来の細胞(CS-A/CS-B相補性群)にUVSSAを発現させた場合、あるいはUV<sup>S</sup>症例由来細胞にCSA, CSBのcDNAを発現させた場合にも、RRSの回復は見られなかったことか

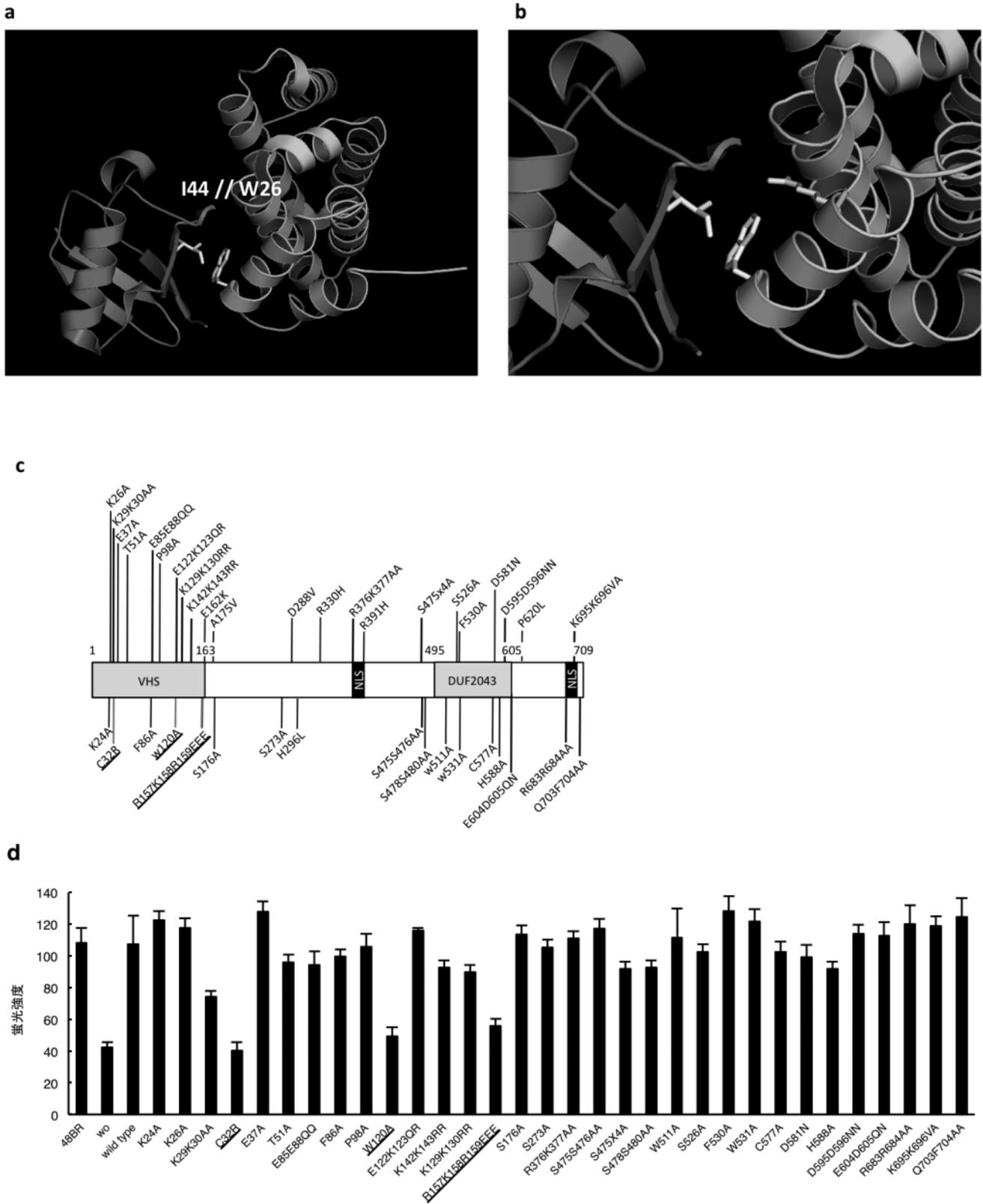


図4 UVSSA タンパク質の機能ドメイン解析

(a) ユビキチンとヒト STAM1-VHS ドメインの結晶構造. ユビキチンの 44 番目イソロイシン残基と STAM1-VHS ドメインの 26 番目トリプトファン残基が相互作用する. (b) XP70TO 症例で確認された Cys32Arg 変異をスーパーインポーズした. (c) UVSSA アミノ酸置換変異体一覧 (下線で示した変異体は機能喪失変異体). (d) UVSSA アミノ酸置換変異体発現ウイルスによる RRS 相補性試験. VHS ドメインの 3 置換変異体で RRS 回復が見られない.

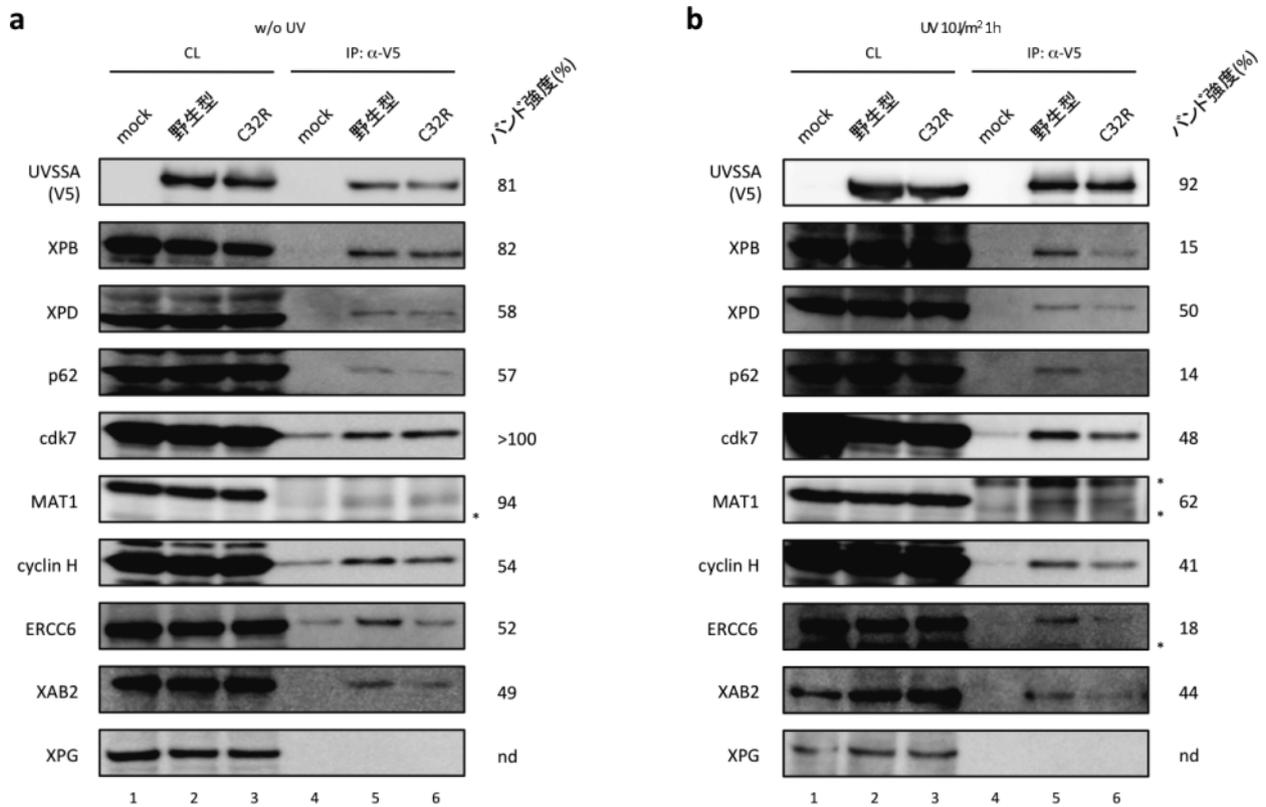


図5 UVSSA タンパク質と TC-NER 因子の相互作用

(a) 紫外線未照射の細胞では、野生型、VHS ドメイン Cys32Arg アミノ酸置換変異体共に同程度の強度で TFIIH 複合体、CSB タンパク質と相互作用する。(b) 紫外線照射後には、Cys32Arg 変異体では相互作用の減弱が見られる。

ら、UV<sup>S</sup>-A と CS は同じ TC-NER の欠損でありながら、互いに臨床的にも分子機能的にもオーバーラップを許しながらも明確に異なるプロセスに参与していることが考えられた。以上の結果をもって、UV<sup>S</sup>-A 相補性群の責任遺伝子が *KIAA1530/UVSSA* であると証明された。

### 3. UVSSA の分子機能解析

UV<sup>S</sup> と CS に共通する責任遺伝子産物である CSA、CSB タンパク質は、TC-NER の開始反応に重要な役割を果たしていることは確かであるが、その分子機構の詳細は一部の断片的な情報を除いて依然として不明瞭な点が多い。分子作用仮説の一つとして、CSB タンパク質複合体が DNA 損傷を受けたクロマチン部位へ CSA タンパク質複合体を誘導し、CSA タンパク質複合体に内在する E3 ユビキチンリガーゼ活性によって、DNA 損傷箇所まで停止している RNA ポリメラーゼのプロセッシングを行うことにより、TC-NER 反応を進行させることが提唱されている<sup>13)</sup>。

UVSSA 遺伝子は、既知のタンパク質ファミリーと相同性を示さない、機能未知のタンパク質をコードしていたが、アミノ酸構造解析の結果、N 末端 1~163 アミノ酸の領域に VHS (Vps-27, Hrs and STAM) ドメイン、C 末端領域には他生物種の UVSSA タンパク質との間で良く保存さ

れている、機能未知の DUF2043 (domain of unknown function 2043) が確認された (図 2/図 4)。また、C 末端、中央領域に二つの核移行シグナル (nuclear localisation signal: NLS1, NLS2) が存在し、抗 UVSSA 抗体とタグ付加 UVSSA タンパク質の蛍光免疫染色により核局在性を示すことが明らかとなった。これら機能ドメインの不可欠性を調査するために UVSSA 部分断片化タンパク質を発現する cDNA を作製し、UV<sup>S</sup> 症例由来細胞に導入して RRS 相補性試験を実施したところ、VHS ドメイン、DUF2043 のどちらか一方が欠いたタンパク質は修復機能を喪失することが確認された。さらに、線虫からヒトの間で保存度の高いアミノ酸残基 32 箇所について置換変異体を作製し、それらの RRS 活性を測定したところ、VHS ドメイン内部の三つの変異 (C32R, W120A, R157E|K158E|R159E) で RRS の欠失が見られた。その他の変異については野生型 UVSSA タンパク質と同程度の活性であった。以上のことから、UVSSA タンパク質の機能に VHS ドメインが重要な役割を果たしていることが示唆された。VHS ドメインを持ついくつかのタンパク質については、ユビキチン結合活性が報告されており、特にヒト STAM1 タンパク質の VHS ドメインについては、ユビキチンとの共結晶構造解析に関する報告がある。この中で、ヒト STAM1-VHS ドメイン

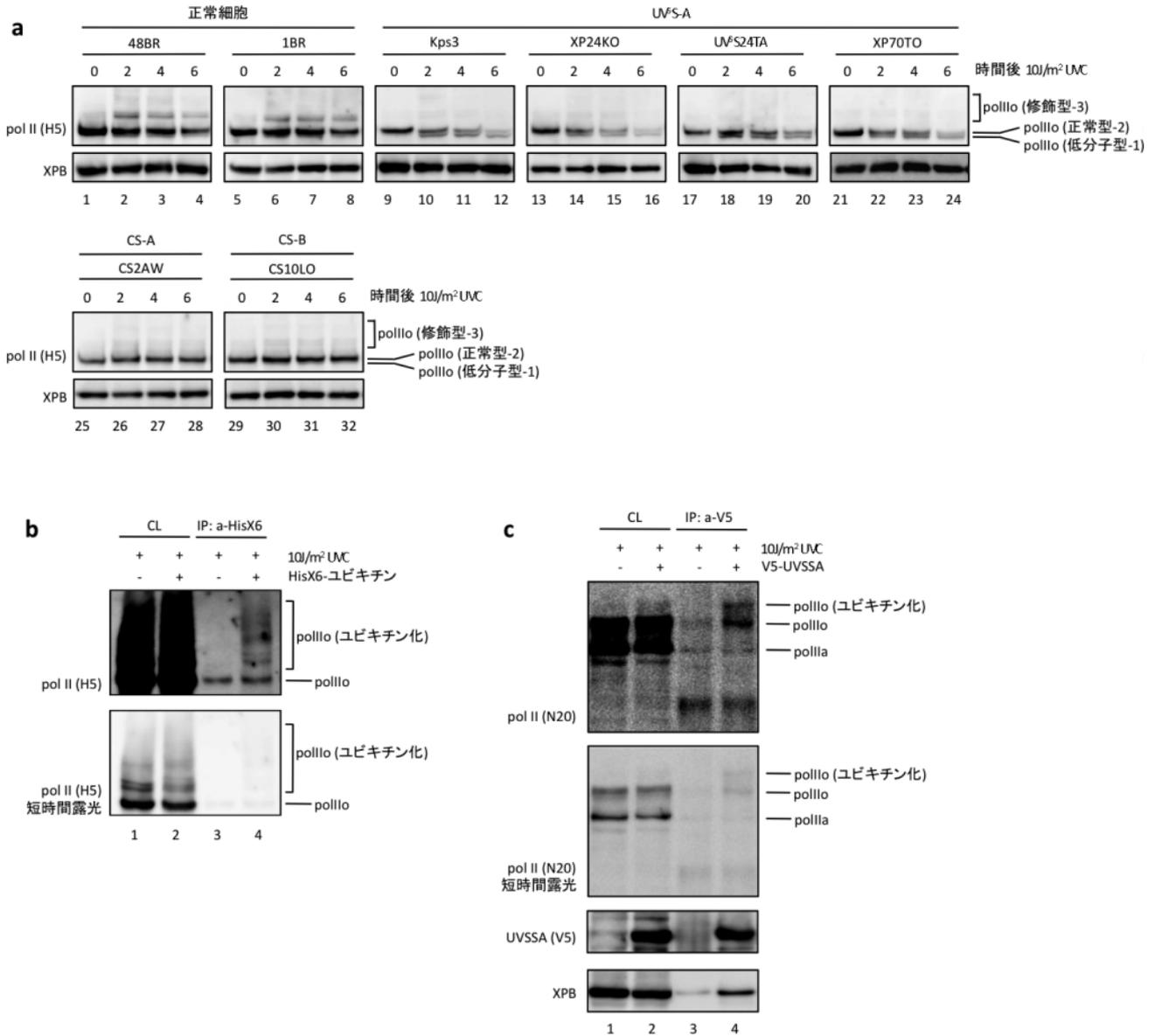


図6 紫外線 DNA 損傷による RNA polIIo のユビキチン化修飾

(a) UVS-A 症例由来細胞では、紫外線照射後に RNA polIIo のユビキチン化修飾が見られず、分解が生じている。(b) his-ユビキチン発現細胞からのプルダウンにより、紫外線照射後の RNA polIIo の高分子量側へのバンドシフトがユビキチン化修飾であることが確認される。(c) UVSSA タンパク質は、ユビキチン化した RNA polIIo と結合する。紫外線照射後のサンプルから UVSSA タンパク質をプルダウンするとユビキチン化 RNA polIIo の濃縮が確認される。

の 26 番目のトリプトファン残基がユビキチンの 44 番目のイソロイシン残基と相互作用することが示されている<sup>20)</sup>。UVSSA に対して、STAM1-VHS ドメイン結晶構造を鋳型とした立体構造予測を行ったところ、UVS 症例(XP70TO)で見つかった UVSSA タンパク質のアミノ酸置換変異 p.Cys32Arg は、STAM1-VHS ドメインの 26 番目のトリプトファン残基が含まれる  $\alpha$ 2-ヘリックスと相似する UVSSA の  $\alpha$ 2-ヘリックス中のアミノ酸に生じており、その結果、VHS-ドメインとユビキチンの相互作用が阻害さ

れる可能性が示唆された。

UVSSA タンパク質と他の TC-NER に関与する各種因子の相互作用を調査したところ、TFIIH 複合体の各因子 (XPB, XPD, p62)、サイクリン依存性キナーゼ活性化キナーゼ (cyclin dependent kinase activating kinase: CAK) の各因子 (MAT1, サイクリン H, CDK7)、さらに CSB タンパク質との相互作用が確認された (図 5)。これら TC-NER 因子との相互作用の程度は野生型 UVSSA タンパク質では紫外線損傷の有無に依存しなかったが、UVS 症例で

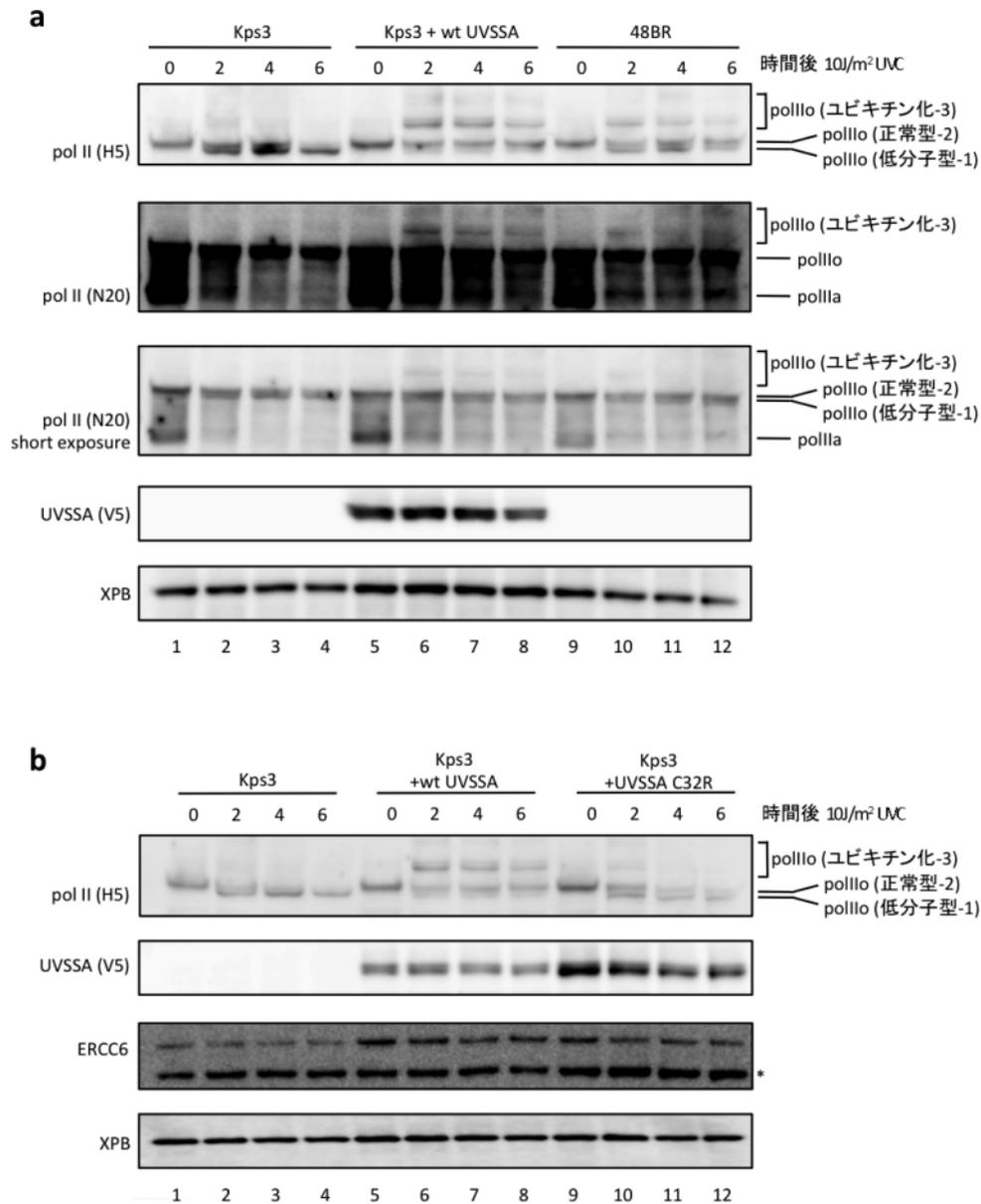


図7 RNA polIIoのユビキチン化修飾にはUVSSAのVHSドメインが必須である  
 (a) 野生型UVSSA遺伝子を発現するレンチウイルスの感染により、UV<sup>S</sup>-A症例由来細胞での紫外線照射後のRNA polIIoの分解が抑制され、ユビキチン化修飾が回復する。(b) VHSドメインCys32Arg変異体の発現ではRNA polIIoユビキチン化の回復は見られない。

確認されたp.Cys32Arg変異を持つ変異UVSSAタンパク質では、紫外線照射後に相互作用の減弱が見られた。

UVSSAタンパク質とユビキチン化タンパク質との相互作用がTC-NER反応に重要な役割を果たしていると考え、そのターゲットとして転写進行中のRNA polIIoに注目した。RNA polIIoは、通常の転写、あるいはDNA損傷などに伴う転写の伸長阻害によってユビキチン化を受けることが知られている<sup>21</sup>。RNA polIIoのユビキチン化に関与するユビキチンE3リガーゼにはいくつかの報告があり、CS原因タンパク質を含むCSA複合体、BRCA1/BARD1、NEDD4などが知られているが、どのE3リガーゼが反応

に関与するかについては互いに矛盾する報告もあり、現在でも議論の余地がある<sup>22,23</sup>。そこで我々は、UV<sup>S</sup>S症例由来細胞でDNA損傷処理後のRNA polIIoのユビキチン化状態の調査を行った(図6)。RNA PolIIの最大サブユニットRBP1のC末端ドメイン(CTD)には、生物種間に共通の反復アミノ酸配列(Tyr<sup>1</sup>-Ser<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Thr<sup>4</sup>-Ser<sup>5</sup>-Pro<sup>6</sup>-Ser<sup>7</sup>)からなるヘプタペプチドが存在し、CTD中のセリン残基のリン酸化状態が、転写の状態(アイドル、転写の開始、転写の進行)に応じて変化する。転写反応の開始時には5番目のセリン残基(Ser5)がTFIIH-CAK複合体のCDK7によりリン酸化され、その後のプロセシブな転写伸長反応の過

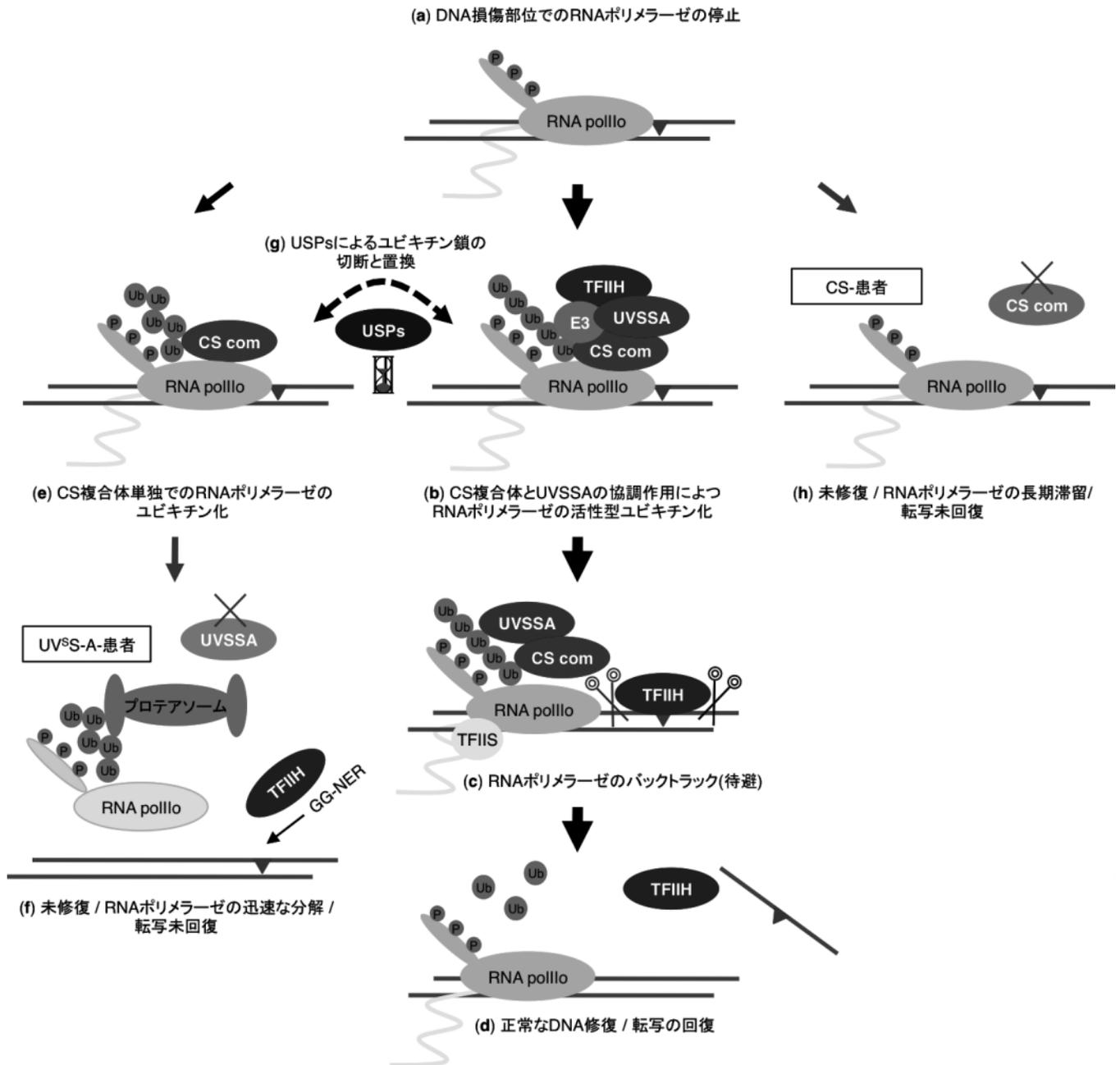


図8 UVSSAによるRNA polIIoのプロセッシングとTC-NER分子機構

(a) RNA polIIoは転写鎖(上側)にDNA損傷(▼印)が存在すると停止する。(b) 停止したpolIIoはCSタンパク質複合体(CScom)とUVSSAにより、ポリユビキチン化修飾を受ける。(c) 修飾されたpolIIoはTFIIHの作用によりバックトラックされることで、NER切り出し反応が進行する。(d) 修復が完了するとpolIIoによるmRNAの転写が再開する。(e) polIIoのポリユビキチン化には安定型と不安定型が存在すると考えられ、UVSSAが関与しないユビキチン化によってpolIIoは分解される。(f) UV<sup>S</sup>-A症例ではこの反応が支配的であるが、損傷箇所での停止したpolIIoは分解され、ゲノム全体のNER機構によりDNA損傷は修復される。(h) CS患者では、polIIoの持続的な停止により、転写が長期間阻害されることで重篤な病態を引き起こすことが示唆される。

程で2番目のセリン残基(Ser2)がさらにリン酸化される<sup>24)</sup>。リン酸化Ser2を選択的に認識するH5抗体を使用し、転写型RNA polII(RNA polIIo)の修飾状態を調べたところ、健常人由来細胞である48BRでは、紫外線DNA損傷処理後にRNA polIIoの高分子量側へのバンドシフトが検出された。このバンドシフトは、His-ユビキチンを発

現する細胞を用いたプルダウン実験により、RNA polIIoのユビキチン化修飾であることが確認された。UV<sup>S</sup>症例由来の細胞について確認したところ、このユビキチン化修飾に由来するバンドシフトは見られなかった。また、以前の報告にもあるが、CS-A、CS-B症例由来細胞でもユビキチン化修飾は起こらない。興味深いことに、UV<sup>S</sup>症例由

来細胞では、紫外線照射後に RNA polIIo の分解に由来すると考えられる低分子量へのバンドシフトが観察された。この低分子量バンドシフトは、健康人由来細胞や CS 症例由来細胞では確認されなかったことから、UV<sup>s</sup>S 症例由来細胞に特徴的な反応と考えられる。ここで、さらに紫外線照射後の UVSSA タンパク質と RNA polIIo との相互作用をプルダウン実験により確認したところ、UVSSA と相互作用する RNA polIIo はユビキチン化修飾したものが濃縮されていることが明らかになった。UV<sup>s</sup>S 症例由来細胞で、紫外線照射後に RNA polIIo のユビキチン化修飾が行われずに分解を受ける現象が、UVSSA の欠損に起因することを確認するために、UV<sup>s</sup>S 症例由来細胞に野生型 UVSSA を発現するウイルスを感染させたところ、ユビキチン化修飾が回復し、polIIo の分解も抑制された (図 7)。また、VHS ドメインの Cys32Arg 変異 UVSSA を発現させた場合には、ユビキチン化修飾は欠損したままであり、polIIo の分解も抑制されなかった。以上のことから、UVSSA タンパク質は、DNA 損傷箇所まで停止した RNA ポリメラーゼのユビキチン化修飾に必須であり、この RNA polIIo のユビキチン化によって、TC-NER 反応が制御されていると考えられた。

#### 4. UVSSA による RNA polIIo ユビキチン化修飾と新しい作用モデル

これまで、TC-NER 反応の開始は CSA/CSB 複合体により制御されていると考えられてきたが、UV<sup>s</sup>S-A 相補性群責任遺伝子のクローニングと UVSSA タンパク質の分子機能解析の結果、DNA 損傷箇所まで停止した RNA polIIo のプロセッシングには CSA/CSB タンパク質の他に、UVSSA タンパク質が必須であることが明らかにされた。これらの結果に基づいて、TC-NER の作用仮説をまとめた (図 8)。DNA 損傷箇所まで停止した RNA polIIo は、CS タンパク質複合体と UVSSA の作用により、ポリユビキチン化修飾を受ける。この修飾された polIIo は TFIIF をリクルートし、ヘリカーゼ活性による巻き戻しと、TFIIS の作用によりバックトラッキング (待避) されることで、NER 切り出し反応が進行する。最終的に修復が完了すると polIIo による mRNA の転写が再開すると考えられる。polIIo のユビキチン化には安定型と不安定型が存在すると考えられ、現時点では、そのどちらのユビキチン化修飾についても、ユビキチン E3 リガーゼは同定されていないか、あるいは論争がある。UVSSA の作用を必要とするユビキチン化は、polIIo を安定的に修飾することで TC-NER 反応を促進する。一方で、UVSSA が関与しないユビキチン化によって polIIo は分解される。UV<sup>s</sup>S-A 症例ではこの反応が支配的であるが、損傷箇所まで停止した polIIo は分解され、ゲノム全体の NER 機構により DNA 損傷は修復される。CS 症例

では、TC-NER を促進する安定的なユビキチン化も、polIIo を分解に誘導する CS 複合体依存性のユビキチン化も生じないために、polIIo の持続的な停止が発生し、これにより転写が長期間阻害される。転写の阻害はアポトーシスを誘導し重篤な病態を引き起こすことが示唆される<sup>2)</sup>。以上の考察から、UV<sup>s</sup>S-A と CS の病態の重篤度の違いには、polIIo のユビキチン化修飾の状態と転写阻害の程度により規定されていると考えることが可能である。今後、UVSSA/CS 複合体の関与する TC-NER 開始反応の詳細な解析が進むことで、CS 等の重篤な症状を示す転写異常疾患の緩和薬、あるいは抗老化薬の候補等の開発につながる と期待される。

#### 文 献

- 1) Itoh, T., Fujiwara, Y., Ono, T., & Yamaizumi, M. (1995) *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 1267-1276.
- 2) Spivak, G. (2005) *Mutat. Res.*, **577**, 162-169.
- 3) Fujiwara, Y., Ichihashi, M., Kano, Y., Goto, K., & Shimizu, K. (1981) *J. Invest. Dermatol.*, **77**, 256-263.
- 4) Kraemer, K.H., Patronas, N.J., Schiffmann, R., Brooks, B.P., Tamura, D., DiGiovanna, J.J. (2007) *Neuroscience*, **145**, 1388-1396.
- 5) Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., & Ellenberger, T. (2005) *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press.
- 6) Itoh, T., Ono, T., & Yamaizumi, M. (1994) *Mutat. Res.*, **314**, 233-248.
- 7) Fujiwara, Y., Uehara, Y., Ichihashi, M., Yamamoto, Y., & Nishioka, K. (1985) *Mutat. Res.*, **145**, 55-61.
- 8) Kawada, A., Satoh, Y., & Fujiwara, Y. (1986) *Photodermatology*, **3**, 233-238.
- 9) Miyauchi-Hashimoto, H., Akaeda, T., Maihara, T., Ikenaga, M., & Horio, T. (1998) *J. Am. Acad. Dermatol.*, **39**, 565-570.
- 10) 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, A., Yoshiura, K., & Ogi, T. (2012) *Nat. Genet.*, **44**, 586-592.
- 11) Itoh, T., Linn, S., Ono, T., & Yamaizumi, M. (2000) *J. Invest. Dermatol.*, **114**, 1022-1029.
- 12) Gillet, L.C. & Scharer, O.D. (2006) *Chem. Rev.*, **106**, 253-276.
- 13) Hanawalt, P.C. & Spivak, G. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 958-970.
- 14) Horibata, K., Iwamoto, Y., Kuraoka, I., Jaspers, N.G., Kurimasa, A., Oshimura, M., Ichihashi, M., & Tanaka, K. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15410-15415.
- 15) Nardo, T., Oneda, R., Spivak, G., Vaz, B., Mortier, L., Thomas, P., Orioli, D., Laugel, V., Stary, A., Hanawalt, P.C., Sarasin, A., & Stefanini, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6209-6214.
- 16) Schwertman, P., Lagarou, A., Dekkers, D.H., Raams, A., van der Hoek, A.C., Laffeber, C., Hoeijmakers, J.H., Demmers, J. A., Fousteri, M., Vermeulen, W., & Marteijn, J.A. (2012) *Nat. Genet.*, **44**, 598-602.

- 17) Zhang, X., Horibata, K., Saijo, M., Ishigami, C., Ukai, A., Kanno, S., Tahara, H., Neilan, E.G., Honma, M., Nohmi, T., Yasui, A., & Tanaka, K. (2012) *Nat. Genet.*, **44**, 593–597.
  - 18) Limsirichaikul, S., Niimi, A., Fawcett, H., Lehmann, A., Yamashita, S., & Ogi, T. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, e31.
  - 19) Nakazawa, Y., Yamashita, S., Lehmann, A.R., & Ogi, T. (2010) *DNA Repair (Amst.)*, **9**, 506–516.
  - 20) Ren, X. & Hurley, J.H. (2010) *EMBO J.*, **29**, 1045–1054.
  - 21) Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., & Warren, S.L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11586–11590.
  - 22) Anindya, R., Aygun, O., & Svejstrup, J.Q. (2007) *Mol. Cell*, **28**, 386–397.
  - 23) Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.C., Ishioka, C., Parvin, J.D., & Chiba, N. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24498–24505.
  - 24) Compe, E. & Egly, J.M. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 343–354.
-