

# Diagnosis of Nucleotide Excision Repair-deficient Disorders By Detection of DNA Repair Activity Using A Rapid Comprehensive Assay System

高精度 DNA 修復活性測定法及び臨床分子診断システムの構築と応用  
— ヌクレオチド除去修復機構異常性疾患の分子診断と応用研究 —  
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 賈 楠

## 研究背景と目的

ヒトゲノムは、様々な損傷要因（紫外線・電離放射線・環境変異源・代謝産物などによる外的要因や複製フォークの停止などの内的要因）に曝されている。これらにより、チミン二量体の形成、DNA 一本鎖切断、DNA 二本鎖切断、クロスリンク損傷、DNA の酸化、脱アミノ化等様々な DNA 損傷が生じる。これらを排除し、ゲノムを安定的に保つためには、DNA 損傷応答（チェックポイント、アポトーシス誘導など）や損傷 DNA 修復機構は非常に重要である。これらの機構が欠損する事により、ゲノム不安定性を誘発し、好発がん性など重篤な症状を示すヒト遺伝性疾患が多数知られている。

ヌクレオチド除去修復機構(Nucleotide Excision Repair: NER)は損傷 DNA 修復機構の1つであり、太陽光に含まれる紫外線によって生じる光 DNA 損傷や、環境変異原によって誘発される付加型 DNA 損傷を除去する。NER は DNA 損傷の探知に関わる経路の違いから、ゲノム全体で働く NER(Global Genome NER: GG-NER)と、RNA 転写と共役して働く NER(Transcription-coupled NER: TC-NER)とに分類される。ヒトにおいては、NER の先天的な欠損により色素性乾皮症(Xeroderma Pigmentosum: XP)やコケイン症候群(Cockayne Syndrome: CS)、紫外線高感受性症候群(UV-Sensitive Syndrome: UV<sup>S</sup>)などが誘発される。皮膚がんを好発する XP(GG-NER が欠損)は日本において罹患率の高い疾患であることから難病指定を受ける等社会的な関心も高い。TC-NER の異常により発症する遺伝性疾患である CS 症例は、発育不全、骨格形成異常、早期老化等重篤な症状を示す。このような病態は、TC-NER の欠損により、DNA 損傷が発生した際に個体の発達に重要な遺伝子の転写が抑制されるために生じるとも考えられる。一方、UV<sup>S</sup> は CS と同様に TC-NER の異常により発症する遺伝性疾患であるが、CS 患者が重篤な病態を呈するのに対して、UV<sup>S</sup> 患者は日光過敏症及び色素沈着などの軽微な症状のみが確認される。細胞レベルでは、UV<sup>S</sup> 患者由来の繊維芽細胞は TC-NER の活性が完全に欠落しており、CS 患者由来細胞との区別が全く付かない。このような細胞応答と臨床症状との食い違いの理由は現在でも明らかにされていない。よって、これらの NER 損傷応答・修復機能欠損性疾患の臨床診断と基盤研究の進展には、新規修復因子の探索が重要である。

本研究では、NER 損傷応答の異常を検出する技法を改良し、自動蛍光画像取得装置に応用することで、迅速かつ客観的に NER 修復活性を評価するシステムの構築に取り組んだ。当検出系は、所属する研究室において運用されているウイルス相補性試験と組み合わせる事で、次世代シーケンシング法によって得られた疾患責任遺伝子候補の真偽検討にも応用可能である他、既知の遺伝子において見つかった新規変異に関しても、病的か否かの判断を容易に行う事ができる。私は、責任遺伝子未知の NER 修復異常性疾患疑い症例を対象に、改良構築した解析技術を活用して臨床診断を実施した。

## 方法と結果

NER の修復活性を評価する定法は、不定期 DNA 合成(Unscheduled DNA Synthesis: UDS)試験と RNA 合成回復(Recovery of RNA Synthesis: RRS)試験である。これまでは、

NER 修復パッチの合成や RNA 転写の際に放射性チミジン/ウラシルを取り込ませ、これらをオートラジオグラフィーにより検出することで、UDS/RRS 活性を評価することが一般的であった。この手法は正確である反面、ラジオアイソトープを使用するために実施者が限られており、また検出までに数週間を要する他、サンプル処理が煩雑で多サンプルを同時に比較検討する事は困難であった。我々は、チミジン誘導体であるエチニルデオキシウリジン (EdU) とエチニルウリジン (EU) を、DNA 損傷処理後に取り込ませ、アルキル-アザイドカップリング反応 (Click-chemistry) により蛍光色素と直接結合させることで、UDS/RRS 活性を核内蛍光強度として定量する手法を確立した (Nakazawa et al. DNA repair 2010)。これにより、オートラジオグラフィー法と同程度の検出感度及び判定の精度を保ったまま、短時間で UDS/RRS 活性の測定が可能となった。また、96 well マルチプレートと VTI array scanner (蛍光画像の自動取得が可能) を用いる事で、簡便かつ短時間での UDS/RRS の多検体同時測定/同時比較が可能となった (図 1)。さらに、蛍光 UDS/RRS 活性測定法を基に、紫外線、電離放射線 (Gamma-ray) 及び抗がん剤 (Mitomycin C) による様々な DNA 損傷に対する細胞生存率を評価する「セル・サーバイバル・アッセイ法」を開発した。

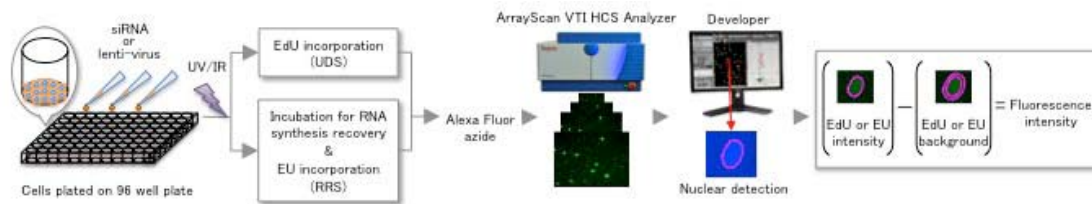


図 1- UDS 活性/RRS 活性/細胞生存率測定法

これらの評価法を用いて、所属研究室が保有する責任遺伝子未知の NER 修復異常性疾患疑い症例 (XP3 例 ; CS16 例) に関して、NER 修復活性を調査した。修復活性に異常が確認された検体に関しては、各種 NER 関連遺伝子を組込んだレンチウイルスによる相補性試験及びサンガーシーケンシングを実施することで、責任遺伝子変異を決定した。既知の疾患責任遺伝子に変異が同定されなかったケースについては、次世代ゲノム解析を実施することで、新規責任遺伝子探索を実施することとした (図 2)。

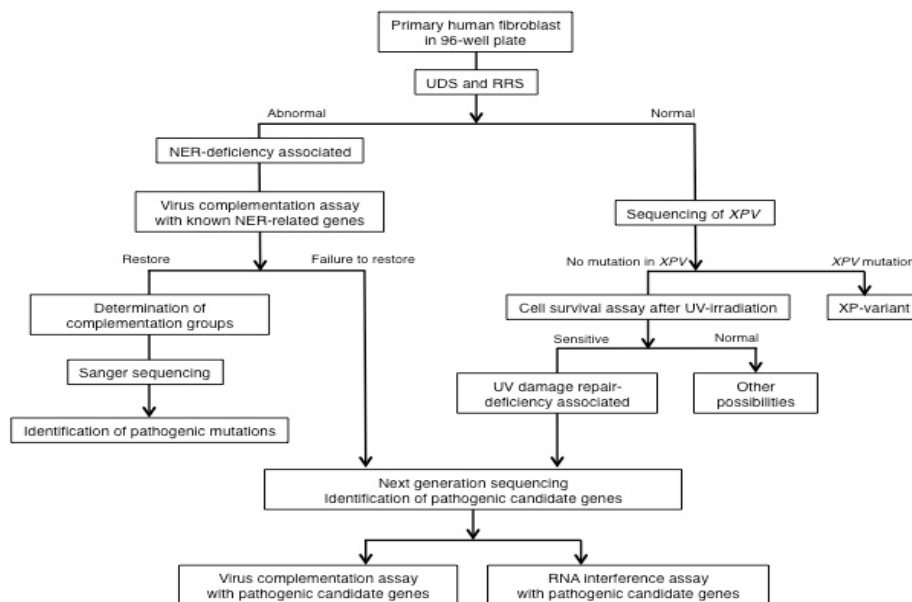


図 2- NER 損傷応答・NER 修復関連遺伝子探索システム

これらの結果、XP 症における解析で、3 例のうちの 1 例は日本人 XP 症例において変異頻度が高い *POLH* 遺伝子のスプライス変異 (c. 490G>T) を認め、XP-V と診断した。残り 2 例、UDS/RRS 活性とともに正常で、かつ *POLH* に変異が認められなかったことから、新規疾患責任遺伝子の異常が原因である可能性が考えられた。今後、次世代シーケンシング法によって責任遺伝子探索を進める事で、新規 DNA 修復関連遺伝子の同定につながると期待される。一方、CS 症 16 例における UDS/RRS 活性測定法とウイルス相補性試験で、全ての症例は TC-NER が欠損していることが判明した (CS-A: 2 例 ; CS-B: 14 例)。さらに、サンガーシーケンシングを実施することで、合計 19 種類の変異を CS 症の責任遺伝子である *CSA/CSB* 遺伝子に同定した (*CSA*: 2 種類 ; *CSB*: 17 種類)。また、2 種類の新規 *CSA* 変異とも、フレームシフト変異によって、*CSA* タンパク質の発現が欠損する事を解明した。一方、本研究で同定した 17 種類の変異のうち、ナンセンス変異 (nonsense mutation; 2 種類)、ミスセンス変異 (missense mutation; 2 種類)、スプライス変異 (splice mutation; 3 種類)、インサージョン・デリージョン変異 (Insertion/Deletion mutation; 4 種類) 合計 11 種類の変異は、これまでに報告のない新規の変異であった。さらに興味深いことに、多くの *CSB* 変異は *CSB* タンパク質の helicase motifs に同定した (図 3)、helicase motifs は *CSB* タンパク質の ATPase 活性及び DNA との結合に重要であることが報告されたが、その TC-NER における詳細な役割はまた明らかにされていない。今後、これらの helicase motifs 分子機序の解明が CS 疾患発症の分子メカニズム解明に繋がると期待される。

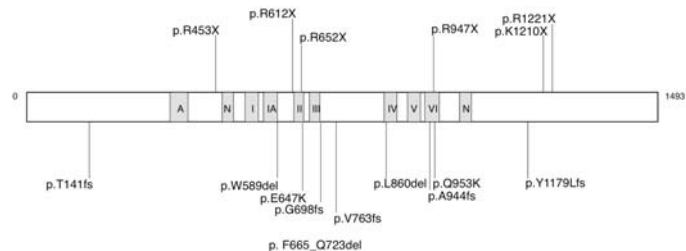


図3- CSB遺伝子変異一覧

## 考察

NER には、未解明の制御機構とそれに関与する複数の未知の因子が存在すると予想される。そのため、疾患ゲノム解析による新規 NER 関連因子及び既知 NER 関連遺伝子の新たな機能性変異の網羅的な探索は、非常に重要であると考えられる。我々の確立した技術は、非放射性チミジン誘導体である EdU/EU と蛍光色素を利用することで、UDS/RRS アッセイのサンプル処理速度を劇的に速め、自動化システムで解析を行う事で、多サンプルの同時比較と解析時間の大幅な短縮を実現した。本システムを用いた臨床診断の過程で NER 関連遺伝子の新たな機能性変異を多数確認しており、有用な解析技術が確立できたと考えられる。今後は、研究室が保有する約 100 例の責任遺伝子未知の DNA 修復異常性疾患疑い症例を対象として臨床診断を行う。可能な限り多くの検体について調査し、既知の責任遺伝子における新規変異の同定と機能解析及び、新規疾患責任遺伝子の探索とその分子機能解析を実施する事で、疾患発症の分子メカニズム解明に貢献したいと考えている。

[基礎となった学術論文]

**Nan Jia**, Yuka Nakazawa, Chaowan Guo, Mayuko Shimada, Mieran Sethi, Yoshito Takahashi, Hiroshi Ueda, Yuji Nagayama, Tomoo Ogi. 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**, 2014 (in press).