

B. 研究方法

患者末梢血中の P40 量の測定

まず、正常コントロールと患者末梢血リンパ球中の P40 量と β -アクチン量とを western blotting で測定し β -アクチンの量で補正し、それぞれの P40 量を測定し、統計学的有意差の有無を確認した。

immune precipitation : 6cm ディッシュに培養した HeLa 細胞を EDTA trypsin ではがして、RIPA 処理した。その上清にそれぞれ P40、tuberin、hamartin の抗体を加えて、セファロース G で沈殿させた。この沈殿物にサンプルバッファーを加えて溶かした上清を western blotting のサンプルとした。

Western blotting : それぞれのサンプルをポリアクリルアミドゲル上で分離して通常の方法でトランスファーを行い、P40 と tuberin hamartin に対する抗体を用いて western blotting を施行した。発色は ECL 法で行った。

Knocked down : P40, TSC1 の SiRNA を作成し、optifect を用いて HeLa 細胞に導入し、導入後 120 時間後の細胞の RNA を Isogen を用いて抽出し、real time PCR で m-RNA 量を測定した。コントロールとしては、同様の方法で、スクランブルドの SiRNA を導入した HeLa 細胞を用いた。

同様の条件でノックダウンし培養した細胞を、集めて RIPA 処理したものの上清にサンプルバッファーを加えたものを western blotting のサンプルとした。これらのサンプルを P40、tuberin、hamartin に対する抗体を用いた Western blotting 法でそれぞれのタンパク量を測定し、ノックダウ

ンによる蛋白の変化を検討した。

real time PCR: ノックダウンした細胞より、isogen を用いて RNA を抽出し super script 3(invitrogen)を用いて cDNA を作成した。作成した cDNA を用いて GAPDH, 18S, TSC1, p40 のプローブを用いて real time PCR を施行し、RNA 量を解析した。

(倫理面への配慮)

患者サンプルを使用する場合は、患者の同意を得た上で、切除標本の一部を使用し、さらに、患者個人が特定できないように注意した。

C. 研究結果

患者リンパ球中の P40 量の測定 :

患者リンパ球中では正常コントロールに比して P40 量が有意に低下していた (図 1)。

共沈実験 :

抗 tuberin 抗体、抗 hamartin 抗体の沈殿物の中に hamartin, tuberin と同時に P40 が認められ、逆に抗 P40 抗体の沈殿物の中に P40 と同時に、hamartin が認められ、P40 と hamartin が蛋白レベルで結合している可能性が示唆された(図 2)。

Knocked down : まず、ノックダウンの効率を確認するために、それぞれ、p40 と TSC1 の SiRNA を用いてノックダウンした HeLa 細胞とコントロールの HeLa 細胞の RNA を Isogen を用いて抽出し、real time PCR でそれぞれの m-RNA 量を測定した。その結果、P40 の m-RNA 量は 20%に、TSC1 の m-RNA 量は 45%に減少しており(図 3, a, b), ノックダ

ウンができていたことが確認できた。そこで、このノックダウンが確認できたこれらのサンプルを用いて、P40、tuberin、hamartin のタンパク量の変化を検討した。その結果、P40 をノックダウンすることにより、P40 タンパクの量は60%以下にhamartin タンパクも60%近くまで減少した。一方tuberin タンパクの減少は80%弱にとどまった。逆に、TSC1 をノックダウンすることにより、hamartin、tuberin タンパクは減少したが、P40 タンパクは変化を認めなかった (図3)。

D. 考察および結論

今回我々は患者リンパ球においても p40 が有意に減少していることを確認した (図1)。ついで、共沈実験より p40 と hamartin がタンパクレベルで結合していることも確認した (図2)。さらに、SiRNA を用いたノックダウン実験では、P40 をノックダウンすることにより、p40 タンパクと同様に、hamartin タンパクが減少し、さらに、tuberin タンパクも軽度減少すること。逆に、TSC1 をノックダウンすることにより、hamartin、tuberin タンパクは減少するが、P40 タンパクは変化を認めないことが確認された。以上より p40 は、hamartin と直接結合することにより、hamartin あるいは、tuberin、hamarti 複合体の安定化に関係してものと考えられた。

E. 研究発表

1 学会発表

1) 第100回近畿集団会 (2007.07)

swannomatosis 1例. 村上由香子、金田眞理、田中まり、片山一朗

2) 第58回中部支部学術大会 (2007.10)

非典型的な臨床像を呈した connectivetissue nevus. 田中まり、金田眞理、片山一朗

3) 8th Congress of the German-Japanese Society of Dermatology (2007.11)

A New protein related to the pathogenesis of tuberous sclerosis complex. Mari Wataya-Kaneda, Chiharu Toyama, Ichiro Katayama

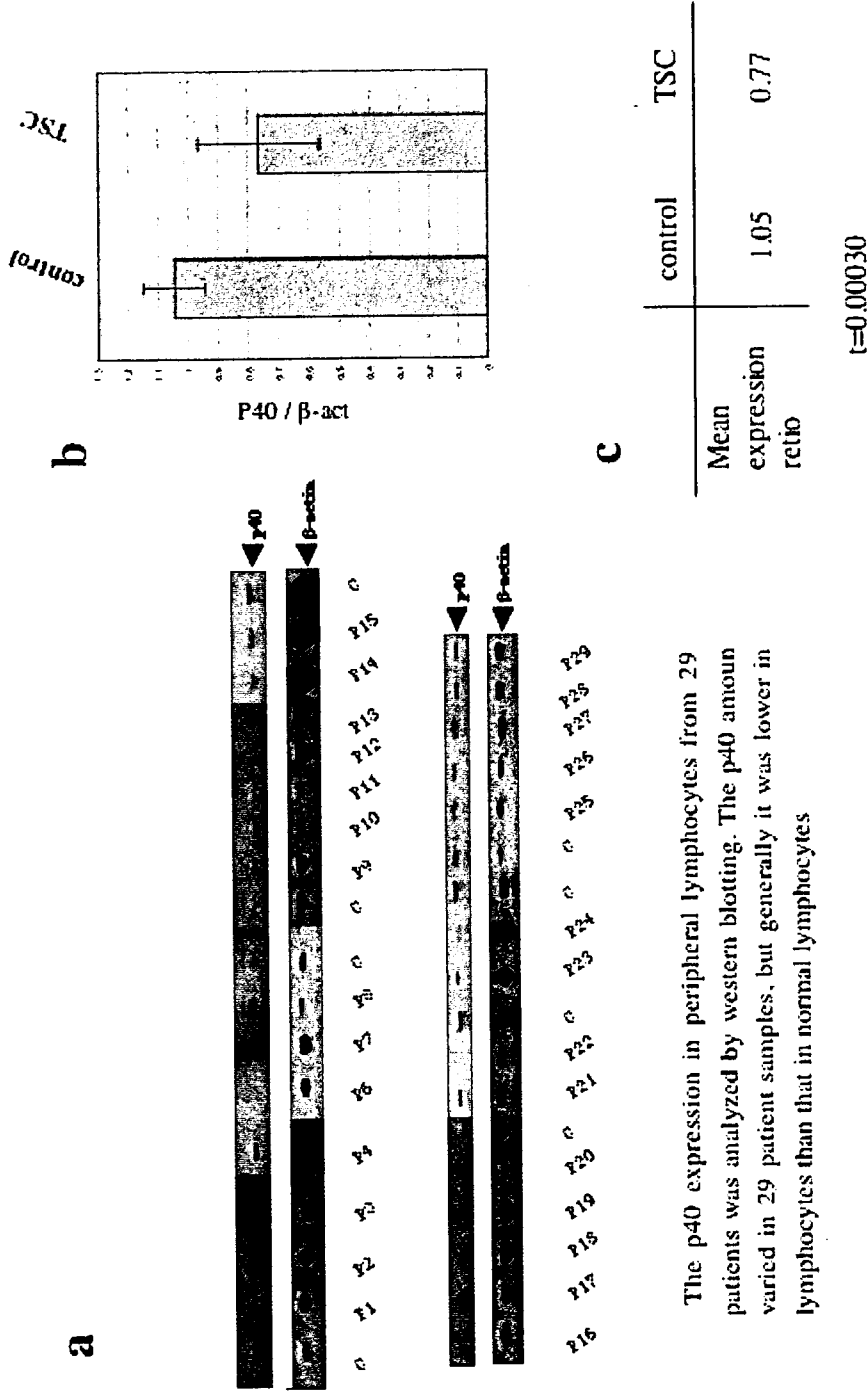


図1 結節性硬化症患者リンパ球におけるp40量

(a) 29人の結節性硬化症の患者と7人のコントロール人の末梢血中リンパ球中のp40量をp40に対する抗体を用いてwestern blottingで検出した。
 (b) western blotting で得られたp40と β アクチンのバンドの量をNIH イメージで測定し、 β アクチン量で補正し、それぞれの平均値をグラフに示した。
 (c) それぞれの値をstudent T testを用いて、有意差を検定した。

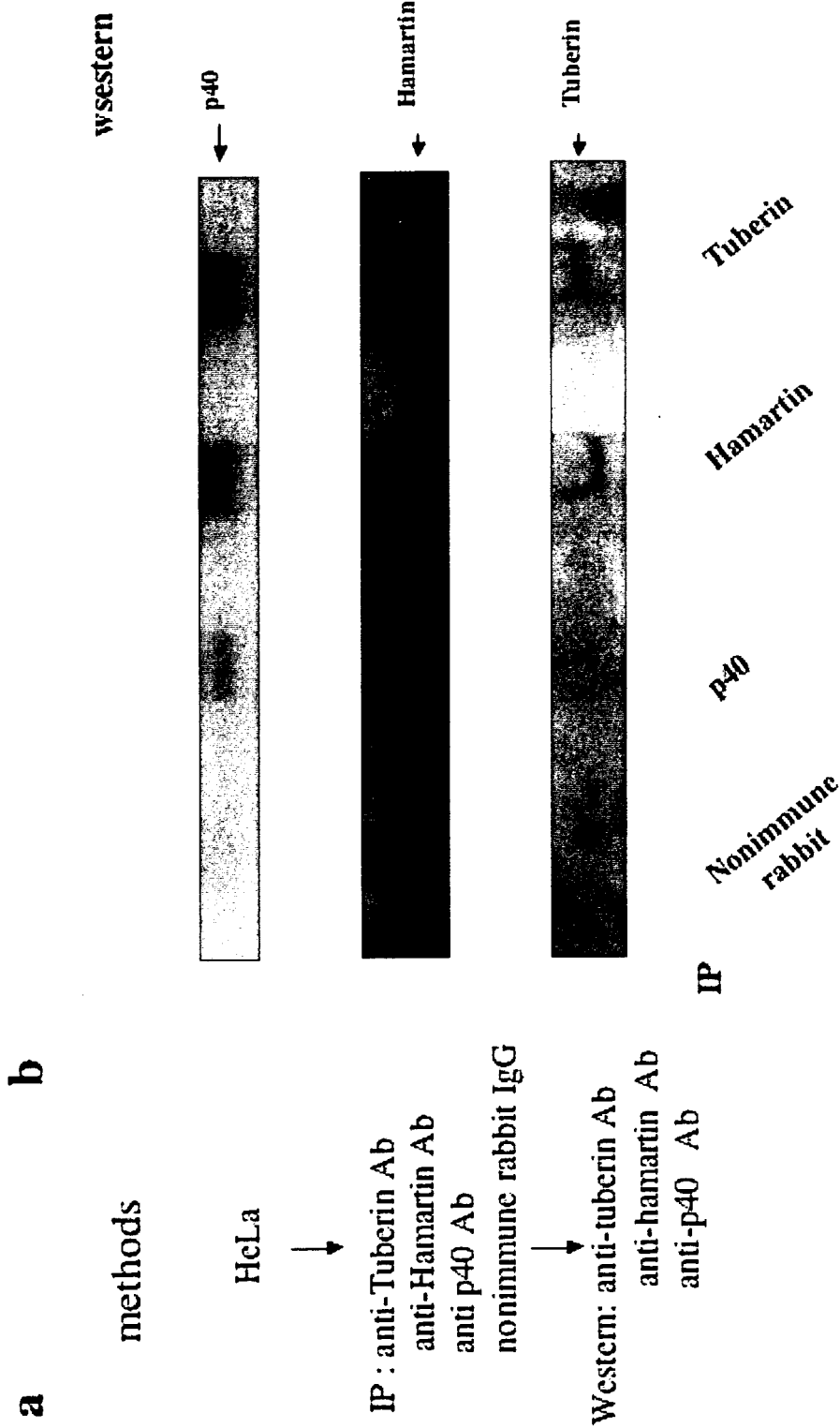
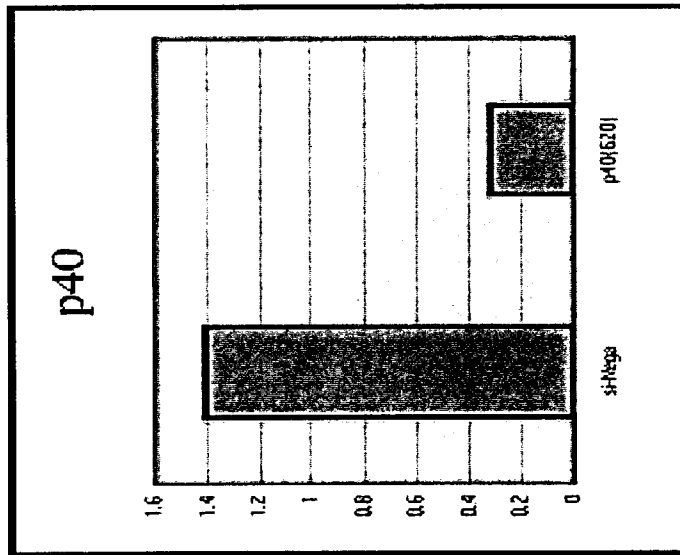


図2 tuberin, hamartin, p40の供沈実験
HeLa 細胞の抽出物を用いて、tuberin, hamartin, p40に対する抗体を用いて供沈殿の実験を試行した。(a)方法、(b) p40とhamartinは共沈殿し、それぞれがタンパクレベルで結合している物と思われた。p40はtuberin, の沈殿物の中に認められたが、tuberinはp40の沈殿物の中には認められなかった。

a



b

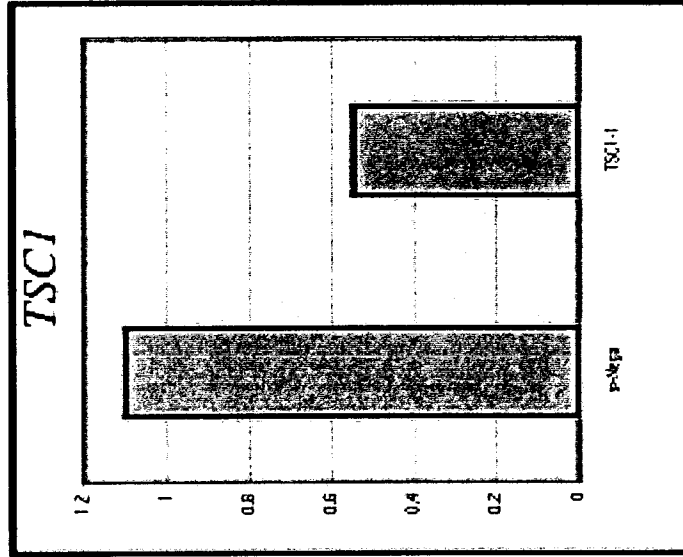


図3 p40とTSCIによるノックダウン効率

p40とTSCIのsi-RNAをデザインして、HeLa細胞に導入し、ノックダウン細胞を作成し、real time PCRを用いてノックダウンの効率を調べた。(a) p40, (b) TSCIのいずれもノックダウンが出来ていた。

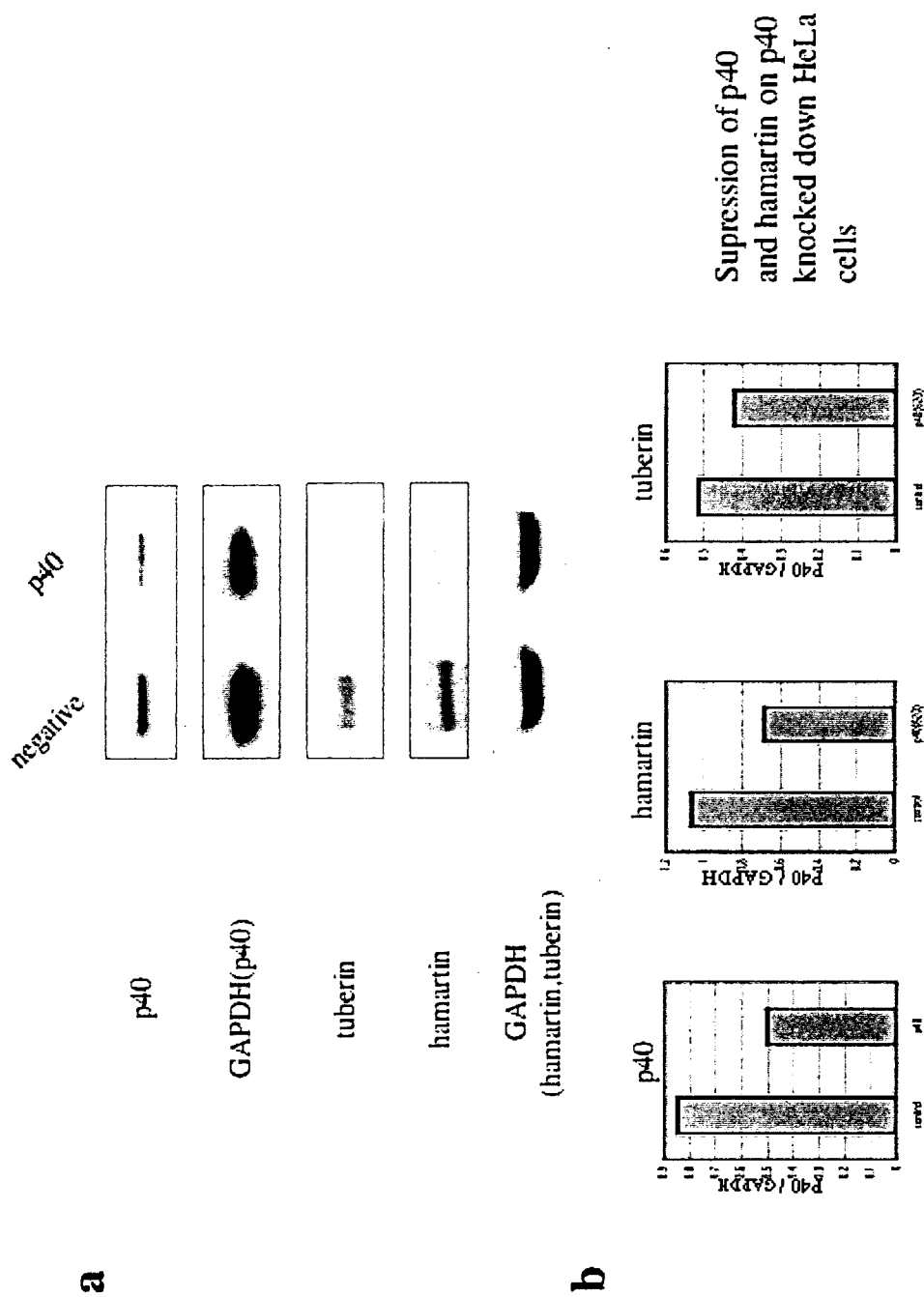
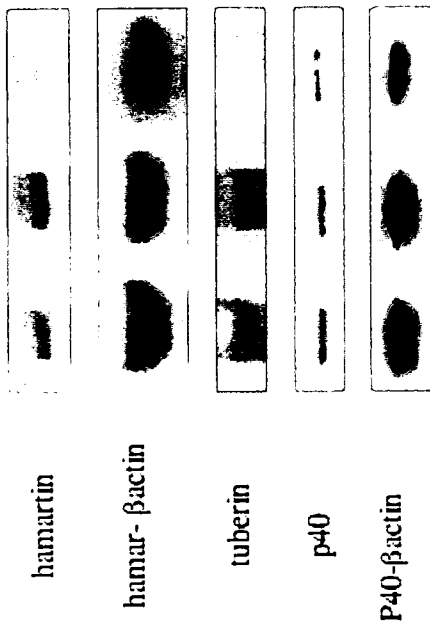


図4 p40 をノックダウンしたHeLa細胞におけるp40, hamartin, tuberin の蛋白質量 (a) p40, hamartin, tuberin のタンパク量をwestern blotting で測定した結果。 (b) GAPDH量で各々蛋白質量を補正し、割合をグラフにしたもの。

a



b

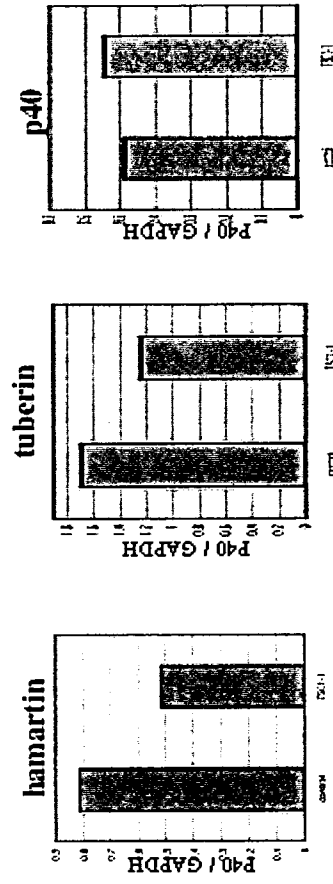


図5 *TSC1* をノックダウンしたHeLa細胞におけるp40, hamartin, tuberin の蛋白質量 (a) p40, hamartin, tuberin のタンパク量をwestern blottingで測定した結果。
 (b) (b) GAPDH量で各々蛋白質量を補正し、割合をグラフにしたもの

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

色素性乾皮症の現状把握：患者把握とその解析の調査研究

分担研究者 錦 織 千 佳 子 神戸大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

色素性乾皮症（XP）の患者数、相補性群の分布などの現状を把握するための一次調査を行った。全国の研修指定病院皮膚科 433 施設中、平成 18 年に訪れた XP 全患者数は 222 名（66 施設）、男女比はほぼ 1、分布は全国に散らばっていた。（但し、回答率は 71.1%）。今後、潜在患者の拾い上げ、疑診例の確定診断、詳細な二次調査の集計を行い、日本の XP 患者の現状の把握を進める予定である。XP 診断の確立、相補性群の分布を正確に把握する一步として XP バリエーション群の確定診断の手法を確立した。

A. 研究目的

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：XP）は紫外線（UV）によって DNA に生じた傷を修復する酵素を欠損するために、日光露光部に皮膚癌を生じる高発癌性遺伝疾患で、日本では除去修復能が低く、神経症状を伴う A 群が多い。現在、XP の全相補性群の原因遺伝子が同定されこの分野が飛躍的に進んだものの、未解明の部分も多いので、診断の確立、遺伝子異常と臨床症状の関連性を明らかにする。そのために、先ず初年度としては正確な患者数とその状況の把握をめざした。XP-V 群は日本では A 群について多い相補性群であるが日光曝露後の紅斑が顕著でないために、遮光は不十分な例が多く、中年以降に露光部に皮膚癌が生じて始めて診断される例が多いので、XP-V 群の診断の確立をめざした。

B. 研究方法

XP の全相補性群に見られる特徴として露光部の皮膚癌発症、露光部の色素斑などの光線過敏症状がみられることから、XP の場合、最初は皮膚科への受診の機会が多いと考え、皮膚科研修指定病院 609 施設を対象に、色素性乾皮症患者の有無等についての一次調査を行なった。調査対象は平成 18 年 1 月から 12 月に当該施設を受信した XP 患者である。平成 19 年 9 月に調査票を郵送し、10 月末を回答期限とし、11 月 19 日に集計を行った。

XP 診断の確立の第一歩として、今までに臨床的、細胞生物学的に XP バリエーション群を強く疑った症例のうち同意書を取得できた 16 症例（患者の年齢分布は 34 才～82 才（平均年齢 57.1 才）男性 10 例、女性 6 例）について、患者線維芽細胞から蛋白を抽出し、DNA ポリメラーゼ η（POLH）の有無を免疫沈降法でみるのと同時に、POLH の塩基配列を

決定し、免疫沈降法の有用性を確認した。あわせて、細胞背物学的な修復能をカフェイン存在下での紫外線致死感受性、不定期 DNA 合成能でみた。

(倫理面への配慮)

一次調査では患者数のみの記載としたので、個人情報などへの配慮は特に行う必要はなかった。

バリエーション群の遺伝子検索については神戸大学倫理委員会の承認を得たうえで、患者の同意を文書にて取得したのちに行った。

C. 研究結果及び考察

[結果]

日本の XP 患者数についてであるが、回答のあった 433 施設 (回答率: 71.1%) のうち、XP 患者を有する施設は 66 施設 (15.2%) であった。全患者数は 222 名で男女比は男性 115 名、女性 107 名 (1.07:1) で、ほぼ 1 であった。地域的には北海道から九州まで比較的広範囲に分布しているが、関西から西日本にかけて患者数が多い傾向がみられた。10 名以上の患者を有する施設が 4 施設あったが、ほとんどの施設で患者数は 5 名以下であった。予想以上に広範囲の地域に広く散在していることが明らかとなった。

バリエーション群疑いの 16 名について *POLH* の塩基配列を決定し、それら *POLH* 遺伝子異常によりポリメラーゼ η の蛋白が作られなくなることを免疫沈降法にて確認した (図 1)。その成果を欧文誌に報告した (文献 1)。XPV 群の原因遺伝子が DNA ポリメラーゼ η と同定された。16 例全例皮膚癌を生じており、皮膚癌初発年齢は 24 才~68 才 (平均 45 才) であった。UDS は 66~115% (平均 87.7%)。コロニー形成能を用いた紫外線致死感受性は正常な

いし軽度感受性で、全例においてカフェイン (0.5 - 1mM) 存在下での紫外線致死感受性の増強を認めた。16 例中 14 例に遺伝子の変異を認めた。そのうち多くは蛋白が途中までしか作られないタイプの変異であった (図 2)。欧米人の既報告例と同じ変異はみられなかったが、日本人において複数みられる変異があった。特にエクソン 4 の最後の塩基が G から T にかわることによりコンセンサス配列が変わり、スプライス異常を来たす変位が 28 アリル中 11 アリル (39%) においてみられ、診断の際、この塩基配列を調べることは有用と思われた。今のところ、変異の型と臨床症状との間に関連性はみられていない。

[考察]

色素性乾皮症は日本に多い疾患であり、海外での情報は日本人に当てはまらないことも多いので、日本人症例の情報については日本人の手で診断、病態解析、疾患への対応を研究する必要性が有り、今回の研究はそれに向けての第一歩となったと考えられる。

免疫沈降法によって、XP バリエーション (V) 群診断をかなりの精度で行えるようになったことから、皮膚癌等の症状が揃うまでに診断を確定することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanioka M, Masaki T, Ono R, Nagano T, Otoshi-Honda E, Matsumura Y, Takigawa M, Inui T, Miyachi Y, Moriwaki S, Nishigori C: Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as

- xeroderma pigmentosum variant type. J Invest Dermatol 127 : 1745-1751, 2007.
2. Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K, Sakumi K, Nakabeppu Y, Nishigori C : Narrow-band UVB induced more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer. J Invest Dermatol 127 : 2865-2875, 2007.
 3. Nagano T, Kunisada M, Yu X, Masaki T, Nishigori C : Involvement of interleukin-10 promoter polymorphism in non-melanoma skin cancers -A case study in non-carcinoma skin cancer patients. Photochem Photobiol 84 : 63-66, 2008.
 4. 錦織千佳子 : 光発癌. 皮膚科診療プラクティス 20 Environmental Dermatology 環境・職業からみた皮膚疾患、戸倉新樹・宮地良樹・瀧川雅浩編、文光堂、41-47, 2007.

2. 学会発表

1. 小野竜輔、正木太郎、千代丸康治、長野徹、錦織千佳子、菅澤薫、井上雄二 : 色素性乾皮症C群の小児例. 第405回日本皮膚科学会大阪地方会、2008.2.16

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1) 特許取得

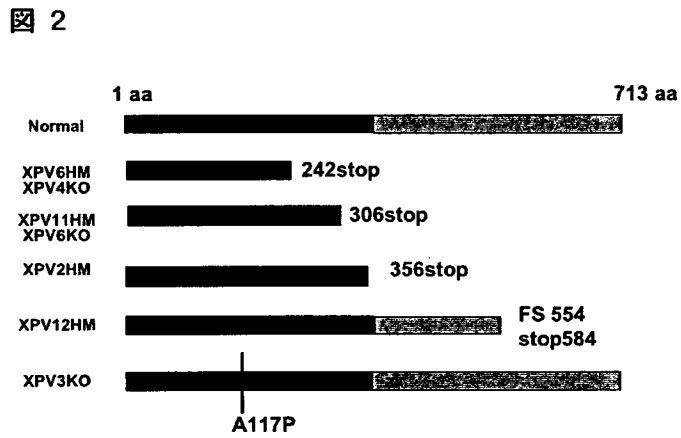
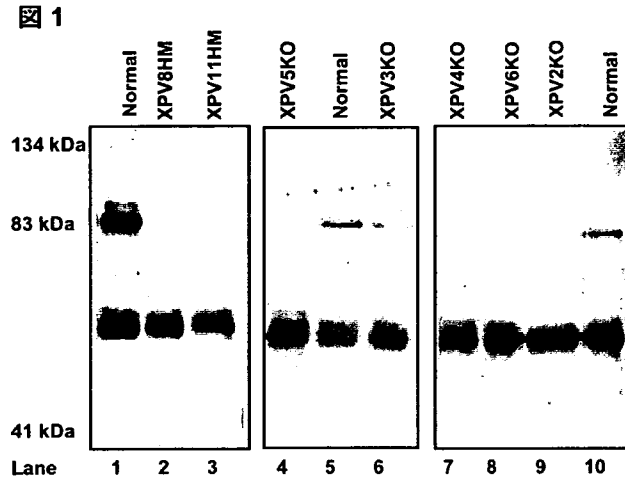
なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし



**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書**

A 群色素性乾皮症における末梢神経障害の経時的変化

分担研究者 荻田典生 神戸大学大学院 准教授

研究要旨

A 群色素性乾皮症 3 例において末梢神経電動検査を経時的に測定した結果、末梢神経障害は下肢優位、感覚神経優位に進行するが、その程度は神経間で差があることが示された。

A. 研究目的

色素性乾皮症に合併する末梢神経障害の経過について電気生理学的に検討する。

(SNAP) の低下がみられた。特に腓腹神経の SNAP は 10 歳代で誘発されなくなった。運動神経伝導速度 (MCV) は、上肢は比較的保たれていたが、後脛骨神経と腓骨神経で 10 歳代に著しく低下し、脛骨神経と腓骨神経の複合筋活動電位 (CMAP) も著明に低下した。

B. 研究方法

A 群色素性乾皮症患者 3 例において、末梢神経伝導検査を 4 年～13 年間、上肢および下肢の末梢神経伝導検査をほぼ年 1 回の頻度で行い、その間の臨床症状と比較した。

A 群色素性乾皮症末梢神経障害は下肢優位、感覚神経優位に進行するが、その程度は神経間で差があることが示された。

(倫理面への配慮)

検査は通常の診療の範囲内で行い、苦痛のないように配慮しながら行った。検査結果はすべて匿名化し患者の個人情報はすべて秘匿した。

D. 健康危険情報

なし

C. 研究結果

3 例とも、歩行障害が目立たない時期から、正中神経、尺骨神経、腓腹神経の感覚神経活動電位

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 関口兼司、幸原伸夫、荻田典生：Fibrillation potential の起源について。臨床脳波 2007, 49(9), 543-548

2. Oishi K, Konishi K, Mori S, Ishihara I, Kawamitsu H, Fujii M, Kanda F: Reduced fractional anisotropy in early-stage cerebellar variant of multiple system atrophy. Journal of Neuroimaging 2008, in press

2. 学会発表

第49回日本神経学会総会にて発表予定

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

色素性乾皮症の神経障害に関する臨床神経病理学的研究

分担研究者 林 雅 晴 東京都神経科学総合研究所臨床神経病理

研究要旨

色素性乾皮症（XP）の神経症状に対する治療法を開発するため、モノアミン神経障害の研究を、剖検脳での免疫組織化学的解析と患者への薬物治療を通じて、開始した。A群XP（XPA）剖検脳で知的障害に関連するアセチルコリン神経障害を見出すとともに、XPA患者の声帯・上肢の不随意運動に対するレボドパ少量療法の有効性を明らかにした。

A. 研究目的

色素性乾皮症（XP）では難治性の神経症状が出現するが、発症メカニズムの詳細は明らかになっていない。本研究では、XPの神経症状に対する治療法を開発することを目的に、剖検脳と患者から提供された生体資料を用いてモノアミン神経障害と酸化ストレスに関する臨床神経病理学的研究を進めるとともに、関連薬物による治療を試みる。

B. 研究方法

平成19年度は、A群XP（XPA）剖検例6例の大脳・小脳・脳幹の連続切片において、知能との関係が重要なアセチルコリン神経をその分解酵素Acetylcholine esterase（AchE）に対する免疫組織化学染色結果から評価した。同時に夜間・摂食時の発作性呼吸障害と上肢の振戦・ミオクローヌスを呈する15歳以上のXPA8名に少量レボドパ（0.3～0.6 mg/kg/日）を投与し、臨床症状と喉頭ファイバー所

見の変化を観察した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は東京都神経研と協力医療機関の倫理委員会から承認されている。剖検脳収集と治療にあたっては十分な説明の上での書面による同意を患者家族から受けている。

C. 研究結果

すべてのXPA剖検例において、知能・歩行発達に重要なマイネルト核と脚橋被蓋核でのAchE表出が高度に低下していたが、カルシウム結合蛋白の表出は比較的保たれていた。一方、XPA患者8例中4例でレボドパ少量療法により声帯の不随意運動である喉頭ジストニアが改善し、夜間・摂食時の発作性呼吸障害の頻度が減少した。さらに前記の4例中2例では上肢の不随意運動も軽減した。

D. 考察

本研究は平成 19 年度から開始され単年度の研究ではあったが、XPA の知的障害とアセチルコリン神経障害との関連を世界で初めて証明できた。アセチルコリン神経障害はアルツハイマー病でも報告されており、同病で使用されている AchE 阻害剤の塩酸ドネペジルが XPA でも有効である可能性が示唆された。以前、XPA 剖検脳でドーパミン神経の障害を明らかにしており、今回、少量のレボドパがドーパミン受容体過感受性を是正して不随意運動の改善につながったと推定された。レボドパ少量療法は知的障害に対しても有効であることが知られており、今後、年少の XPA 患者の知的障害に対しても同治療を試みるべきと考えられた。

E. 結論

XP の神経症状に対する治療法を開発することを目的に、剖検脳と生体資料を用いて、モノアミン神経障害や酸化ストレスに関する研究を平成 19 年度から開始した。XPA 剖検脳で知的障害に関連するアセチルコリン神経障害を見出すとともに、一部の XPA 患者において声帯・上肢の不随意運動に対してレボドパ少量療法が有効であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- 1) 林雅晴. 色素性乾皮症 (XP) - 難病指定までの道のり. 医学のあゆみ; 222(6/7): 486-7, 2007 (レビュー)。

- 2) Hayashi M. Role of oxidative stress in

xeroderma pigmentosum. In: Ahmad SI, Hanaoka F, ed. Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum. Austin: Landes Bioscience. 2007 (epub) (レビュー)

2. 学会発表

- 1) 林雅晴. シンポジウム I : 発達期脳障害と酸化ストレス. 第 48 回日本神経病理学会総会学術集会, 東京 (2007, 5.30)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものは無い。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

**色素性乾皮症やコケイン症候群におけるヌクレオチド除去修復、
転写の異常**

分担研究者 田 中 亀 代 次 大阪大学大学院生命機能研究科教授

研究要旨

ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構は種々の DNA 損傷を修復し、遺伝情報の維持に重要な役割を担う。色素性乾皮症 (XP) は日光紫外線高感受性、高頻度皮膚がん発生、神経異常を臨床的特徴とする常染色体性劣性遺伝疾患で、NER 機構に異常をもつ。また、NER 機構においては、転写を阻害し細胞死を誘発する転写鎖上の DNA 損傷を特異的に修復する「転写と共役した修復」(TCR) 機構が存在し、その異常は遺伝的早老症コケイン症候群 (CS) を発症する。本研究では、XP や CS の原因遺伝子産物である XPG、XPD、CSA、CSB 等の機能解析を行った。紫外線照射を受けた細胞では、CSA ユビキチンリガーゼ複合体は、CSB や TFIIH 依存性に核マトリックスに移行し、DNA 損傷部位で転写を停止した RNA ポリメラーゼ II_o や CSB と結合し、それらをユビキチン化した。また、ユビキチン化された CSB はプロテアソームにより分解された。以上の結果は TCR 機構の解明に貢献するものである。他方、色素性乾皮症 G 群 (XPG) 遺伝子に突然変異をもち、XP と CS を合併する患者 (XP-G/CS) では、TFIIH の安定性に異常を示すこと、その結果、ホルモン受容体の転写活性化に異常を示すことを明らかにした。CS 徴候が NER 異常に加え、転写の異常にも起因することを強く示唆し、CS の病態解明に貢献した。さらに、微小核融合法を用い、転写や TCR 機構に異常をもつ CS の類縁遺伝疾患の原因遺伝子の同定をめざし、研究を推進した。

A. 研究目的

色素性乾皮症 (XP) やコケイン症候群 (CS)、その類縁疾患である頭眼顔骨格症候群 (COFSS) や紫外線高感受性症候群 (UV^sS) の原因遺伝子のクローニングを行うと共に、その機能解析を行い、ヌクレ

オチド除去修復、転写、それらのクロストークの分子機構を解明し、XP、CS、その類縁疾患の分子病態の解明を本研究の目的とした。

B. 研究方法

色素性乾皮症(XP)やコケイン症候群(CS)の遺伝子産物の生化学的、分子生物学的機能解析(トランスクリプトーム、プロテオーム解析を含む)を行った。また、RNAiによるノックダウン細胞の作成により、細胞レベルでの当該遺伝子の機能の解明を行った。さらに、原因遺伝子が未知の遺伝疾患(COFSS、UV^s等)について、微小核導入法を用い、原因遺伝子の同定を試みた(ゲノミクス解析)。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する試料は、既に細胞バンクに登録され、学術論文に発表されている患者由来の皮膚繊維芽細胞であり、個人情報と連結不可能匿名化された状態で研究用に広く一般に利用されている細胞である。従って、これらの試料を研究に使用するには、インフォームドコンセント、個人情報管理体制などは免除されると考えられる。

C. 研究結果

(C-1) 紫外線損傷により誘導される、CSAの核マトリックスへの移行

我々が見つけた本現象(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:201-206, 2002)の分子機構や「転写と共役した修復(TCR)」における意義を解明するため、コケイン症候群A群蛋白質(CSA)が核マトリックスへと移行する無細胞系を構築した。そして、この無細胞系を用い、TCRに異常を持つCS-A患者由来の変異CSAは核マトリックスへ移行しないこと、CSAの核マトリックスへの移行はコケイン症候群B群蛋白質(CSB)のみならず機能的なTFIIHに依存すること、クロマチン構築や転写伸長活性にも依存す

ることを明らかにした(*Molecular and Cellular Biology*, 27: 2538-2547, 2007)。以上の結果は、TCR機構解明に貢献する成果である。(図1)

(C-2) CSA複合体の機能解析

我々は以前より、CSAを蛋白質複合体として精製し、CSAがDDB1、Roc1、Cullin4A、COP9 signalosomeと複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ(E3)活性を持つことを明らかにした(*Cell*, 113: 357-367, 2003)。CSA複合体E3の機能解析を本研究で進め、そのターゲットの一つはCSBであり、紫外線照射によってCSBがユビキチン化され、プロテアソームによって分解されることを共同研究で明らかにした(*Genes & Development*, 20: 1429-1434, 2006)。さらに、RNAポリメラーゼIIoもCSA複合体E3によりユビキチン化されることを示唆した(論文作成中)。

(C-3) XPGはTFIIHと安定な複合体を形成し、転写活性化に関与する

XPGが、転写とNERに必須のTFIIHと安定な複合体を形成し、転写活性化に関わることを見いだした。しかも、XP-G/CS患者ではこのXPG-TFIIH複合体が不安定となり、TFIIHによる核内レセプターの活性化が起こらないことを明らかにした(*Molecular Cell*, 26: 231-243, 2007)。これらの結果は、DNA修復因子として知られていたXPGが、TFIIHの安定性に関与することで転写にも重要な役割を担うこと、コケイン徴候が転写の異常にも起因することを示したものである。(図2)

(C-4) XAB2複合体の解析

我々は、以前、XPA、CSA、CSB、RNAポリメラーゼII(PolIII)と細胞内で相互作用し、転写やTCR

に關与する XAB2 タンパク質を単離した (*J. Biological Chemistry*, 275: 34931-34937, 2000)。オランダの Mullenders 博士の研究グループにより、XAB2 は紫外線損傷部位で転写を停止した PolIII に、CSA と CSB 依存性に結合することが明らかになっている。本研究では、XAB2 を蛋白質複合体として精製し、mRNA スプライシングに關与することが示唆される 6 つの因子からなることを明らかにした。また、XAB2 と XPA、XAB2 と PolIII の相互作用が DNA 損傷を受けた細胞内で増強することを確認した。XAB2 を siRNA によりノックダウンした細胞を作成したところ、紫外線高感受性を示すと共に、RNA 合成及び mRNA スプライシングの異常を示した (*J. Biological Chemistry*, 283: 940-950, 2008)。これらの成果は、TCR 機構の解明に重要な貢献をするものである。

(C-5) 転写伸長因子 TFIIS は、RNA ポリメラーゼ IIo (Pol IIo) の 8-oxo Guanine 部位における転写伸長のバイパスを促進する

DNA 損傷部位で RNA ポリメラーゼ IIo (PolIIo) が転写伸長を停止することが TCR 開始につながると考えられている。そこで、TCR 機構解明のために、PolIIo が種々の損傷に遭遇した時、如何なる反応を示すかを調べた。紫外線損傷や酸化的損傷等を 1ヶ所に持つ oligo-dC tailed DNA template と ヒト Pol II を用いた in vitro 転写系を用い (*Methods in Enzymology*, 408: 214-223, 2006)、PolIIo が損傷部位に遭遇した時、転写を停止あるいはバイパスする機構を解析した。酸化的 DNA 損傷である 8-Oxo-Guanine、2-OH-Adenine、8-Oxo-Adenine の場合、一部は転写を停止したが、一部は損傷をバイパスした (*J. Biological*

Chemistry, 278, 7294-7299, 2003、*DNA Repair*, 6: 841-851, 2007)。この転写伸長系に、転写伸長因子 TFIIS を加えた時、8-Oxo-Guanine の場合に PolIIo の転写バイパスが促進されることを明らかにした (*DNA Repair*, 6: 841-851, 2007)。これらの結果は、転写鎖上の酸化的損傷で転写伸長を停止した PolIIo が転写伸長因子によりバイパスを促進され細胞死が回避されること、あるいは TCR 機構により修復される可能性を示唆する成果である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isao Kuraoka, Shinsuke Ito, Tadashi Wada, Mika Hayashida, Lily Lee, Masafumi Saijo, Yoshimichi Nakatsu, Megumi Matsumoto, Tsukasa Matsunaga, Hiroshi Handa, Jun Qin, Yoshihiro Nakatani and Kiyoji Tanaka. Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription and transcription-coupled repair. : *J. Biological Chemistry*, 283: 940-950, 2008.
- (2) Shinsuke Ito, Isao Kuraoka, Pierre Chymkowitch, Emmanuel Compe, Arato Takedachi, Chie Ishigami, Frédéric Coin, Jean-Marc Egly and Kiyoji Tanaka. XPG stabilizes TFIIF allowing transactivation of nuclear receptors: Implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. : *Molecular Cell*, 26: 231-243, 2007.
- (3) Masafumi Saijo, Tamami Hirai, Akiko Ogawa, Aki Kobayashi, Shinya Kamiuchi and Kiyoji Tanaka. Functional TFIIF is required for

- UV-induced translocation of CSA to nuclear matrix.: *Molecular and Cellular Biology*, 27: 2538-2547, 2007.
- (4) Isao Kuraoka, Kyoko Suzuki, Shinsuke Ito, Mika Hayashida, Joan Seah Mei Kwei, Takahisa Ikegami, Hiroshi Handa, Yusaku Nakabeppu and Kiyoji Tanaka. RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. : *DNA Repair*, 6: 841-851, 2007.
- (5) Masanobu Kawanishi, Kazuki Matsukawa, Isao Kuraoka, Takeji Takamura-Enya, Yukari Totsuka, Yasuko Matsumoto, Masahiko Watanabe, Yue Zou, Kiyoji Tanaka, Takashi Sugimura, Keiji Wakabayashi and Takashi Yagi. Molecular evidence of involvement of nucleotide excision repair (NER) system in repair of the mono ADP-ribosylated DNA adduct produced by pierisin-1, an apoptosis-inducing protein from cabbage butterfly. : *Chemical Research in Toxicology*, 20: 694-700, 2007.
- (6) Hironobu Ikehata, Tetsuya Ono, Kiyoji Tanaka and Takeshi Todo. A model for triplet mutation formation based on error-prone tranlesional DNA synthesis opposite UV photolesions. : *DNA Repair*, 6: 658-668, 2007.
- (7) Ingrid van der Pluijm, George A. Garinis, Renata M.C. Brandt, Theo G.M.F. Gorgels, Susan W. Wijnhoven, Karin E.M. Diderich, Jan de Wit, James R. Mitchell, Conny van Oostrom, Rudolf Beems, Laura J. Niedernhofer, Susana Velasco, Errol C. Friedberg, Kiyoji Tanaka, Harry van Steeg, Jan H.J. Hoeijmakers, and Gijsbertus T.J. van der Horst. Impaired genome maintenance suppresses the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in mice with Cockayne syndrome.: *PLoS Biology*, 5: 23-38, 2007.
- (8) Hironobu Ikehata, Fumitaka Yanase, Toshio Mori, Osamu Nikaido, Kiyoji Tanaka and Tetsuya Ono. Mutation spectrum in UVB-exposed skin epidermis of Xpa-knockout mice: frequent recovery of triplet mutations. : *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48: 1-13, 2007.
- (9) Takashi Narita, Tetsu M. C. Yung, Junichi Yamamoto, Yasunori Tsuboi, Hideyuki Tanabe, Kiyoji Tanaka, Yuki Yamaguchi, and Hiroshi Handa. NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs.: *Molecular Cell*, 26: 349-365, 2007.
- (10) Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro, Akemi Kakino, Hiroki Shima, Naduparambil Jacob, Ravindra Amunugama, Kristine Yoder, Shunsuke Izumi, Isao Kuraoka, Kiyoji Tanaka, Hiroshi Kimura, Masae Ikura, Shuichi Nishikubo, Takashi Ito, Akihiko Muto, Kiyoshi Miyagawa, Shunichi Takeda, Richard Fishel, Kazuhiko Igarashi and Kenji Kamiya. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. : *Molecular and Cellular Biology*, 27: 7028-7040, 2007.

2. 学会発表

- (1) Kiyoji Tanaka, Transcription and NER deficiencies in XP/CS cells. Gordon Research Conference, "Mammalian DNA Repair", February 4-9, 2007, Ventura, CA, USA
- (2) Kiyoji Tanaka, Katsuyoshi Horibata, Chie Ishigami, Genetic analysis of UV-sensitive syndrome. CEE European Network Meeting, October 20-22, 2007, Molsheim, France.
- (3) 田中亀代次、西條将文、堀端克良、成田 央、伊藤伸介、竹立新人、安藤大輔、平山卓磨、Li-Jing Tan、鈴木恭子、越出千晶 「ヌクレオチド除去修復と転写の共役：分子機構と疾患」 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会 シンポジウム「DNA修復研究の最前線」

F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし