Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Differences in Clinical Phenotype Among Patients with XP Complementation Group D; 3-D Structure and ATP-Docking of XPD in silico

中野, 英司

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2014-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6047号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006047

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Differences in Clinical Phenotype Among Patients with XP Complementation Group D; 3-D Structure and ATP-Docking of XPD *in silico*

色素性乾皮症D群患者における臨床症状の相違；XPD蛋白の3-D構造とATPドッキングに関する *in silico* 解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
皮膚科学
（指導教員：錦織　千佳子教授）

中野　英司

色素性乾皮症（Xeroderma Pigmentosum；XP）は著明な光線過敏症状を呈し、若年から日光暴露部に皮膚癌を生ずる常染色体劣性遺伝性疾患である。XPはDNA修復機構に関わる遺伝子の変異や欠失によって引き起こされ、その原因遺伝子から8つのグループに分類される。DNA修復機構の一つである、ヌクレオチド除去修復に関わる因子の障害によるA群からG群と、ヌクレオチド除去修復は正常であるものの損傷乗り越え複製の障害によるバリアント型から成る。XPは比較的まれな疾患ではあるが、欧米での頻度が数十万人に一人であるのに対し、本邦では2.2万人に一人と高頻度に見られる。日本人にはA群とバリアント型が多く、欧米ではC群、D群が多い。各相補性群によって様々な程度の光線過敏などの皮膚症状および神経症状を呈する。

XPD群（XP-D）は重度の光線過敏症を呈し高率に皮膚癌を発症し、神経症状を伴うことが多いとされているが、その重症度は個々の症例によって様々である。また欧米からの報告では、遺伝子解析の結果、*XPD*遺伝子の683番目のコドンにhot spotがあり、アルギニンがトリプトファンへと変異するR683Wが患者の73%に見られ、また、それらの症例においては神経症状の合併が多い。一方、日本からのXP-Dの報告では、遺伝子解析を実施した症例は少ないが、皮膚癌を発症するものの神経症状は無いか、軽症である。XPD蛋白は、ATP依存性5'-3'DNAヘリケースで、ヌクレオチド除去修復においては、損傷部分のDNA二本鎖を巻き戻し、ほどくことによって、修復を進行させる働きを持つ。近年、古細菌のXPD蛋白の結晶解析がなされ、その立体構造が報告されているが、ヒトにおいては、未だ結晶化されていない。XPD蛋白は二つのヘリケースドメインとFe-Sクラスター、アーチドメインの4つのドメインから形成され、ヘリケーススーパーファミリー特有の保存された領域を持つ。また、二つのヘリケースドメインの間にATP結合領域が存在している。今回、我々は日本人4家系6症例の神経症状を伴わないXP-D患者につき、診断および遺伝子解析、また *in silico* でヒトXPD蛋白のシミュレーション解析を行った。

自験例は全例において幼少時より強い光線過敏症状を有し、露光部には色素沈着を認め、多数の色調、大きさの不揃いな色素斑を認めていた。4例では皮膚癌を発症していたものの、神経症状を伴う患者は認めなかった。紫外線によるDNA損傷の修復能を調べる為に、患者皮膚より線維芽細胞を樹立し、紫外線照射後の不定期DNA合成、コロニー形成能による紫外線致死感受性試験を行った。不定期DNA合成、コロニー形成能ともに正常コントロールに比べ、全例ともに低下を認めた。つまり、DNA修復能の低下があり、XPを示唆する所見であった。しかし、重症型であるA群患者細胞と比較すると、低下の程度は軽く、XPの中間群が疑われた。XPの各相補性群のcDNAを含有するプラスミド導入による宿主細胞回復試験では、患者細胞に*XPD*のcDNAを導入したときのみルシフェラーゼ活性の回復を認め、患者をXP-Dと診断した。*XPD*遺伝子の全エクソン領域をダイレクトシークエンスで解析した。遺伝子解析の結果、6例中4例はhot spotに変異を認めたが、欧米の報告で見られたR683Wとは異なり、アルギニンがグルタミンに変異するR683Qであった。6例のうち姉妹の2例はR683QとdelG19の共有ヘテロ変異、姉弟の2例はR683QとQ368Xの共有ヘテロ変異であった。他の2例には

血縁関係は無いが、同じ S541R のホモ変異であった。del619 と Q368X はこれまでに未報告の変異であった。

これらの遺伝子変異の影響を調べるため、ModBase より得られた wild-type の XPD 蛋白の立体構造と、欧米で多く見られる R683W、自験例で見られた R683Q、S541R、del619 について *in silico* でアミノ酸置換、欠失させ、構造最適化を行ったうえで、立体構造を用いて解析した。wild-type と比較すると、それぞれのアミノ酸置換、欠失の影響で立体構造も変化していた。表面の静電ポテンシャル解析では、wild-type において ATP 結合部位は正に帯電しているのに対し、各変異蛋白においてはゼロ、または負の帯電に変化しており、ATP 結合能が低下すると予想された。そこで、ATP と XPD 蛋白とのドッキング解析を行った。ATP の結合部位とその向きが報告されているが、wild-type においては 100 回の解析で 50 回既報告と同じ向きでの結合を認めた。一方、S541R、del619、R683Q においてはそれぞれ 100 回中 22 回、32 回、34 回同じ向きでの結合を認めた。しかし R683W においては同じ向きに結合することは無かった。以上より、R683W は ATP との結合能が極端に低下していると考えられるが、S541R、del619、R683Q は wild-type よりは劣るものの ATP との結合能はある程度残存すると考えられた。

調べ得る限り、XP-D において遺伝子解析がなされ、かつ神経症状の有無について述べられている症例は 37 症例あり、自験例の 6 症例を追加し、43 例について遺伝子変異と臨床症状の関連について検討した。43 例のうち、R683W をホモ変異で持つものは 7 例あり、R683Q をホモ変異で持つものも 7 例認めた。R683Q のホモ変異症例では、7 例中 3 例は神経症状を認めず、3 例は軽微な神経症状を呈し、1 例が神経症状を認めたとされている。一方、R683W をホモ変異として持つ 7 例は、6 例が神経症状を呈し、1 例は軽微な症状であった。皮膚症状に関してみてみると、R683W では皮膚癌の発症の有無について記載があった 5 例中 5 例ともに皮膚癌を発症し、平均初発年齢は 15.4 歳以下であった。一方で R683Q では記載のあった 5 例中 4 例が皮膚癌を発症し、平均初発年齢は 35.3 歳であった。神経内科医の診察や画像検査などを含めた総合的な判断無くして神経症状の重症度を客観的に評価することは簡単では無く、また皮膚癌の発症も紫外線暴露量などの因子も関連するが、R683W と R683Q を比較すると前者の方が臨床症状として重症例が多いと考えられた。

XPD 遺伝子の変異の多くはヘリケースドメインに集中しており、変異によって DNA 結合や ATPase 活性が低下すると考えられる。R683 はヘリケースドメインに位置しており、既報告では R683W はヘリケース活性が無いとするものと、正常よりも劣るものの残存しているとする報告がある。R683W と R683Q の比較では後者の方が ATPase 活性と ssDNA 結合能が前者よりも高いとする報告がある。我々の *in silico* 解析においても後者においては正常よりも劣るものの ATP とのドッキングを認めたのに対し、前者は ATP とのドッキングは認めなかった。XPD 蛋白は ATP 依存性 DNA ヘリケースであり、ATP の加水分解によって DNA の巻き戻しを行っており、これらの報告および解析結果はそれぞれの変異を持つ患者の重症度の違いと関連している可能性がある。また、S541R や del619 においても R683Q と同様に、臨床症状として比較的軽症であるのは ATP とのドッキング能が残存することで説明しうる。

以上より、欧米で報告の多い R683W は ATP との結合能がほとんど無く、臨床症状として重症例が多いのに対し、本邦で見られた R683Q、S541R、del619 は ATP との結合能が残存し、臨床症状の軽症化に働いていると考えられた。つまり、XP-D 患者における臨床症状の差異は遺伝子変異の違いと関連することが示唆された。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2407 号	氏　名	中野　英司
論文題目 Title of Dissertation	色素性乾皮症 D 群患者における臨床症状の相違； XPD 蛋白の 3-D 構造と ATP ドッキングに関する in silico　解析 Differences in Clinical Phenotype Among Patients with XP Complementation Group D; 3-D Structure and ATP-Docking of XPD in silico		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	森田 奥生 菊 康博 南 博信	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum; XP）は、著明な光線過敏症状を呈し、若年での皮膚癌の発症を認める常染色体劣性遺伝性疾患である。稀な疾患ではあるが日本での発症頻度は 22,000 人に 1 人で欧米諸国よりも高いとされる。XP は遺伝的相補性テストにより A-G 群、V 型の 8 つに分けられている。XP D 群患者（XP-D）は、臨床症状としては重症例が多いと報告されているが、個々の症例によって症状は様々である。特に欧米からの報告では皮膚症状、神経症状ともに重症で死亡例も多く見られるのに対し、本邦の症例では若年での皮膚癌の発症など、皮膚症状は見られるものの神経症状を合併する例は少ない。遺伝子解析の報告では、683 番目のコドンに hot spot があり、欧米ではアルギニンからトリプトファンへの変異（R683W）が多く、その遺伝子変異を持つ患者は重症例が多い。本邦では遺伝子解析を行った報告が少ないものの、R683W は 1 例でしか見られていない。XPD 蛋白は紫外線 DNA 損傷に対する DNA 修復機構である、ヌクレオチド除去修復に関わる ATP 依存性の DNA ヘリケースであり、損傷部位の DNA の二重らせんを巻き戻す事によりほぐし、オープンスペースを作ることにより修復酵素が損傷部位に集まりやすくさせると考えられている。近年、古細菌において XPD 蛋白の結晶解析がなされているが、ヒト XPD 蛋白はまだ結晶化されていない。

本研究で、申請者らは 4 家系 6 症例の XP-D を臨床的かつ遺伝学的に評価を行い、*in silico* でヒト XPD 蛋白のシミュレーション解析を行った。対象症例は全例で光線過敏症状および色素沈着やそばかす様の皮疹などの皮膚症状を認め、若年での皮膚癌の発症を認める症例もあり、色素性乾皮症としての皮膚症状は顕著であったが、神経症状は全く見られなかった。患者皮膚から樹立した線維芽細胞を用いた紫外線照射後の不定期 DNA 合成や紫外線致死感受性試験では全例ともに紫外線損傷に対する DNA 修復の低下を認めた。しかし、日本で最も多く見られる重症型の A 群では不定期合成能が正常コントロールの 5%以下であるのに対し、今回の 6 例はいずれも正常コントロールの 30%程度に保たれており、かつ、紫外線感受性も A 群と正常コントロールの中間程度の値を示した。プラスミド導入による宿主細胞回復試験において、XPD cDNA の導入により DNA 修復能の回復が見られたことから XP-D と確定診断した。全例において原因となる遺伝子変異を同定し、うち二つの遺伝子変異（del619、Q368X）は既報告のない遺伝子変異であった。欧米で多く見られる R683W を持つ症例はなく、おなじ 683 番目のコドンの変異ではあるが、グルタミンへと変異する R683Q が 4 例に共有ヘテロ変異として見られた。血縁関係のない 2 例には同じ S541R のホモ変異を認めた。*In silico* での XPD 蛋白のシミュレーション解析では、正常蛋白と S541R、del619、R683Q、R683W の各変異蛋白の比較を行い、変異蛋白では立体構造、表面の静電ポテンシャルが正常蛋白とは異なることを示した。

また、ATP とのドッキング解析では、変異蛋白は正常蛋白に比べ ATP との結合能が低下しているが、各変異蛋白の中でも低下の程度が異なることが示唆され、特に、欧米で多く見られる遺伝子変異でかつ、臨床的に重症な症例の多い R683W では、ATP とのドッキン

グ能の低下が顕著であり、既報告の向きでのドッキングを認めなかった一方、比較的症状が軽症である患者に見られるS541RやR683QではATPとのドッキング能はある程度残存していた。申請者による内外の既報告のまとめではR683WとR683Qをホモ変異としてもつ患者はそれぞれ7例ずつ報告されているが、R683Wでは皮膚癌の発症は報告のあった全例で見られ、かつ発症が早く、神経症状も多いのに対し、R683Qでは皮膚癌の発症はあっても比較的高齢で、神経症状も軽微である症例が多い。他の研究者によるR683WとR683Qの蛋白の機能を比較した実験ではR683QがR683WよりもssDNA結合能やATPase活性が高いとする報告もあり、それについても今回の結果と合わせて考察している。

以上より、著者らは蛋白の機能の違いが、臨床的な重症度の違いを説明しうると結論付けており、genotype-phenotype の相関を理論的に説明するものである。よって、本研究はXPD遺伝子の変異がXPDタンパクの構造の違い、ひいては機能の違いに結びつき，それが臨床症状の差となりうるという重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格が有ると認める。