

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00541

研究課題名(和文) 転写共役ヌクレオチド除去修復因子の生化学的解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of transcription coupled nucleotide excision repair factors

研究代表者

唐田 清伸 (KARATA, Kiyonobu)

名古屋大学・環境医学研究所・研究機関研究員

研究者番号：90345017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：RNAの転写と共役して働く転写共役型ヌクレオチド除去修復(TC-NER)におけるCSA・CSB・UVSSAといったTC-NER特異的因子の詳細な働きは未だ不明である。そこで、DNA損傷を部位特異的に導入したDNAテンプレートを作製して、*in vitro* TC-NERアッセイ系を再構築して生化学的にTC-NER特異的因子の機能解明することを目指した。また、UVSSAの機能解明の手がかりとするために、結晶構造解析を目的としたUVSSAタンパク質の精製を行なった。

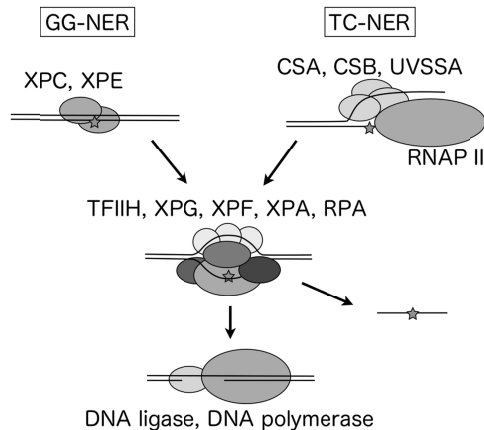
研究成果の概要(英文)：The detailed function of TC-NER-specific factors, CSA, CSB and UVSSA, remains to be defined. In order to elucidate their function biochemically, we tried to reconstitute *in vitro* TC-NER assay system using DNA templates harboring a site-directed DNA damage. In addition, we have developed the purification method of UVSSA protein for its X-ray crystal structure analysis.

研究分野：分子生物学

キーワード：塩基除去修復 RNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は常に様々な損傷に曝されていて、細胞はそれぞれの損傷を修復するために複数の DNA 修復システムを兼ね備えている。ヒトにおいて最も主要な修復機構であるヌクレオチド除去修復 (Nucleotide Excision Repair : NER) では、まず DNA 損傷を認識する因子が損傷部位を同定し、そこに NER 複合体が集積して損傷を含む DNA フラグメントを切り出し、その結果生じる一本鎖ギャップ領域を DNA ポリメラーゼが埋めて修復が完了する。



この NER には最初の損傷認識様式だけが全く異なる 2 つの経路が存在する。1 つは特異的に DNA 損傷に結合する因子がゲノム全体をサーベイして損傷を認識する Global Genome NER (GG-NER) である。もう 1 つは、活発に転写中の RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) が鋳型 DNA 中の損傷部位で停止することがシグナルとなり損傷を認識する Transcription Coupled NER (TC-NER) である。TC-NER では、停止した RNAPII に TC-NER 特異的因子 CSA、CSB が結合し、そこへ GG-NER と同様に NER 複合体が集積して NER の主要反応が進む。CSA と CSB は後述のコケイン症候群の原因因子として 20 年以上前に同定されているが、CSA と CSB が TC-NER において果たす役割の分子メカニズムは未だ不明であった。CSB は RNAPII と CSA さらに主要な NER 複合体因子と相互作用することから停止した RNAPII に NER 複合体を呼び込む働きをしていると考えられているが、どのように停止した RNAPII だけを識別するか等まだ不明な点が多い。また CSB にはクロマチンリモデリングに関わる SWI/SNF ドメインがあり、精製タンパク質に ATP 依存的ヘリカーゼ活性があることも示されているが、その活性が TC-NER と関連性があるのかも不明であった。一方、CSA には WD40 モチーフがあり、Cullin-RING ユビキチンリガーゼと結合することからユビキチン E3 リガーゼであると容易に推測され、実際に DNA 損傷時に相互作用パートナーの CSB をユビキチン化することが示されている。しかし、TC-NER における CSB のユビキチン化の意義は不明であり、DNA 損傷時には RNAPII も速やか

にユビキチン化されることが判明しているが、その反応を CSA が担っているのかについても明確な答えは無かった。

NER は非常に幅広い DNA 損傷の修復に携わっているが、ヒトでは特に紫外線による損傷のほとんどが NER によって修復される。そのため NER タンパク質の欠損は日光過敏性で重篤な遺伝病を惹起する。色素性乾皮症 (Xeroderma Pigmentosum : XP) は GG-NER の主要因子が欠損した遺伝疾患であり、患者は太陽光に非常に過敏で露光部では高頻度の発ガンを伴うのが特徴である。これに対して TC-NER のみに欠損があるコケイン症候群 (Cockayne Syndrome : CS) と紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive Syndrome : UVsS) では、XP 同様に日光に対して過敏ではあるが、GG-NER が機能しているため高頻度の発ガンは見られない。CS も UVsS も同じ CSA または CSB 遺伝子の変異で発症するが、CS と UVsS の病態には大きな違いがある。CS では発達障害・神経障害・早老や眼・耳・内臓障害などの全身性の重篤な症状を呈し短寿命 (20 歳以下) である。一方 UVsS では軽微な日光過敏症を呈するのみで全身性の重篤な症状は全く見られない。同じ遺伝子の変異が全く異なる病態を示すこと等から世界中の多くの研究者が興味を持ち、これまで数多くの研究がなされてきていて病態の違いを説明するいくつかの仮説が提唱されていた。CSB が RNAPII の活性を促進するというデータ等から CS の患者では TC-NER だけでなく普段の転写そのものに異常が生じているという説と、CS の患者由来の細胞は酸化損傷に感受性を示すことなどから内在性の酸化ストレスが原因であるとする説が多くみられたが、どちらも完全に病態の違いを説明できるものでは無かった。

さらに申請者の研究室で UVsS 患者のエクソーム解析から UVsS の新たな原因遺伝子として UVSSA を同定した (Nakazawa et al., Nature Gene 2012)。UVSSA は細胞内で RNAPII や CSA と相互作用していて、TC-NER に必須の因子であることが証明され、UVSSA は脱ユビキチン化酵素 USP7 と相互作用して、RNAPII のユビキチン化・安定化に関与すること等が判明した。長い間 TC-NER は CSA と CSB のみによって制御されていると考えられていたところに新たな制御因子の発見は驚きであった。UVSSA は損傷部位で停止した RNAPII の制御を行っていると考えられることから TC-NER では停止した RNAPII 自体がどのように処理されるかがキーポイントになることが判明してきていた。

< 引用文献 >

Nakazawa, Y., K. Sasaki, N. Mitsutake, M. Matsuse, M. Shimada, T. Nardo, Y. Takahashi, K. Ohyama, K. Ito, H. Mishima, M. Nomura, A. Kinoshita, S. Ono, K. Takenaka, R. Masuyama, T. Kudo, H. Slor,

A. Utani, S. Tateishi, S. Yamashita, M. Stefanini, A.R. Lehmann, K.I. Yoshiura, and T. Ogi. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase II processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics*, 44: 586-592. (2012)

2. 研究の目的

本研究は、詳細な機能が不明である CSA・CSB・UVSSA のそれぞれの機能を明らかにして、TC-NER において各因子がどの段階でどのような機能を発揮して、RNAPII の DNA 損傷部位での停止から損傷の修復までに至るかを分子レベルで明らかにすることが目的である。

この分野の研究はほとんどが細胞レベルでの研究で、TC-NER に関わる因子を単離して *in vitro* でその活性を解析したものは限られている。そこで本研究ではこれまでとは異なる側面から、つまり RNAPII や個々の TC-NER 関連因子を単離・精製してその生化学的解析によってそれぞれの因子の機能を詳細に分析することから始める。そして TC-NER 因子同士が協調して発揮する活性を考察しながら、最終的には *in vitro* で TC-NER の転写・修復反応系を再構築することで、TC-NER 反応機構の解明を目指す。細胞中と異なり *in vitro* の反応系では、DNA テンプレートのクロマチン構造の影響を排除してより単純化した系で活性を評価出来るなど、これまでよりクリアな成果が得られると期待される。

そして、TC-NER 機構の分子メカニズムを解明していき、できれば CS や UVs の発症のメカニズムや CS と UVs 間で病態が大きく異なることの原因究明に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 部位特異的に DNA 損傷を導入した TC-NER テンプレート作製と *in vitro* アッセイ系

転写中の RNAPII が DNA 上で停止する反応を *in vitro* で再現するために、DNA の鋳型鎖の一部に損傷を付加した DNA テンプレートを作製する。まず DNA 損傷に見立てた蛍光標識塩基を部位特異的に導入した DNA テンプレートを作製して、蛍光修飾部位で RNAPII が停止する *in vitro* 転写系を構築する。RNAPII はすでに報告のある方法に改良を加えて精製するが、TC-NER 因子の UVSSA, CSA, CSB をそれぞれ精製して活性を *in vitro* で検証することも視野に入れる。

この基質を用いることにより、DNA 損傷に見立てた蛍光修飾塩基で RNAPII が停止し、そこで TC-NER 反応が進めば蛍光を含む DNA フラグメントが切り出されるので、切り出された蛍光を検出することにより簡便に TC-NER の活性が評価できるはずである。

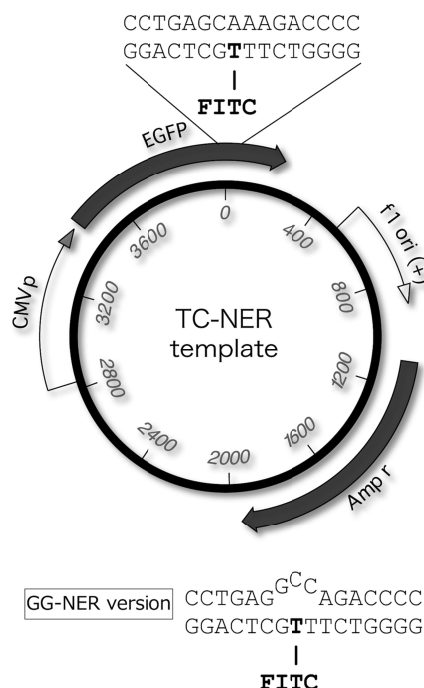
(2) UVSSA タンパク質の結晶化と構造解析

申請者の研究室で UVs の責任因子として新たに同定された UVSSA は TC-NER に必須であることが明らかになっているが、その具体的な機能は全く不明である。そこで UVSSA の機能解明の手がかりとするために、結晶構造解析を目的として UVSSA タンパク質を高度に精製し、結晶化・X 線結晶構造解析を行う。その結果から明らかになった構造を基にして UVSSA タンパク質の機能を推測し、その詳細な機能解析を進めていく。

4. 研究成果

(1) 部位特異的に DNA 損傷を導入した TC-NER テンプレート作製と *in vitro* アッセイ系

TC-NER 反応の *in vitro* 再構成系の確立のため、蛍光物質 (FITC) 修飾を DNA 損傷にみた DNA テンプレートの構築を行った。具体的には、まず EGFP 発現プラスミドベクターに f1 ori を組み込み、大腸菌で繊維状ファージを増殖させて環状一本鎖 DNA を調整する。それに蛍光修飾を含む合成 DNA オリゴをアニールして、DNA ポリメラーゼと DNA ライゲースで環状二本鎖へと合成して作製した。その結果、下図に示すように GFP 遺伝子中の転写される鎖側の 1 カ所に FITC ラベルを組み入れた DNA プラスミドを構築することに成功した。さらには、損傷部位にバブル構造を導入して GG-NER による認識を亢進させ GG-NER 用テンプレートも同様に作製した。



このテンプレートを用いて HeLa の抽出液による TC-NER 反応の再現を試みたところ、RNAPII の基質である rNTP 依存的に蛍光物質 (FITC) の切り出しがみられた。しかしなが

ら HeLa 抽出液中のヌクレアーゼ活性が非常に高く、切り出された FITC を含むフラグメントは通常の TC-NER で切り出されるものよりかなり小さな断片であった。

(2) UVSSA タンパク質の結晶化と構造解析

TC-NER に重要で機能が未知の UVSSA の結晶構造解析を目的として、UVSSA タンパク質の精製をおこなった。UVSSA は非常に不溶性であるため精製が困難であったが、大腸菌の系において界面活性剤を利用することで UVSSA を精製することに成功した。しかし界面活性剤存在下ではタンパク質の結晶化が難しく、新たに界面活性剤が無い条件で UVSSA を精製する方法を模索した。UVSSA 中の疎水的アミノ酸残基を変異させるなどいくつかの対策を試みた結果、UVSSA と共発現させることで UVSSA タンパク質を可溶化させる因子をみいだした。この因子存在下で、数 mg/ml という高濃度の UVSSA タンパク質を精製することに成功し、結晶化スクリーニングを開始した。しかしながらそれでも UVSSA タンパク質の結晶化には至らず、さらに高純度かつ高濃度の UVSSA タンパク質標品を得るために精製方法のさらなる改良・検討が必要であった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Calmels N, Botta E, Jia N, Fawcett H, Nardo T, Nakazawa Y, Lanzafame M, Moriwaki S, Sugita K, Kubota M, Obringer C, Spitz MA, Stefanini M, Laugel V, Orioli D, Ogi T, Lehmann AR. Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome. *J Med Genet*. 査読有, 2018, 55(5):329-343.

DOI: 10.1136/jmedgenet-2017-104877.

Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Karata K, Kawano T, Nishiyama A, Yamato M, Koike T. Specific glutamic acid residues in targeted proteins induce exaggerated retardations in Phos-tag SDS-PAGE migration. *Electrophoresis*. 査読有, 2017, 38(8):1139-1146.

DOI: 10.1002/elps.201600520.

[学会発表](計9件)

荻 朋男, 岡 泰由, 郭 朝万, 賈 楠, 唐田 清伸, 中沢 由華. DNA 修復システムの異常により発症するヒト疾患の分子病態. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年
賈 楠, 中沢 由華, 郭 朝万, 唐田 清伸, 岡 泰由, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. コケイン症候群と紫外線高感受性症候群の分子病態解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

郭 朝万, 中沢 由華, 嶋田 繭子, 唐田 清伸, 賈 楠, 岡 泰由, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. TC-NER 因子 UVSSA による RNA ポリメラーゼ II のユビキチン化に関する分子機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

岡 泰由, 郭 朝万, 賈 楠, 唐田 清伸, 中沢 由華, 荻 朋男. トランスオミクス解析を用いた希少遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

中沢 由華, 岡 泰由, 郭 朝万, 賈 楠, 唐田 清伸, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患群の病態解析と新規疾患責任遺伝子変異探索. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

荻 朋男, 中沢 由華, 唐田 清伸, 郭 朝万, 岡 泰由, 賈 楠, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子. ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の症例収集と病態解析研究. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年

中沢 由華, 荻 朋男, 唐田 清伸, 郭 朝万, 岡 泰由, 賈 楠, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子. ゲノム不安定性を示す難治性遺伝性疾患群の症例収集とゲノム・分子機能解析による病態解明研究. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年

賈 楠, 中沢 由華, 荻 朋男, 唐田 清伸, 郭 朝万, 岡 泰由, 嶋田 繭子, 宮崎 仁美, 千住 千佳子. 各種コケイン症候群の分子診断. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年

郭 朝万, 中沢 由華, 嶋田 繭子, 賈 楠, 唐田 清伸, 岡 泰由, 宮崎 仁美, 千住 千佳子, 荻 朋男. XRCC4 deficiency in human subjects causes a marked neurological phenotype but no overt immunodeficiency. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐田 清伸 (KARATA, Kiyonobu)

名古屋大学・環境医学研究所・研究員

研究者番号: 90345017

(2) 研究分担者

荻 朋男 (OGI, Tomoo)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 80508317