

平成30年5月25日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08279

研究課題名(和文) エロンガンAの標的遺伝子の同定と伸長/ユビキチンリガーゼ両機能間の変換機構の解明

研究課題名(英文) Identification of Elongin A target genes and clarification of the mechanisms governing conversion of the Elongin complex from its elongation factor to its ubiquitin ligase form

研究代表者

麻生 悌二郎 (Aso, Teijiro)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：20291289

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)：Elongin A (EloA) は、RNAポリメラーゼII (Pol II) によるmRNA鎖合成を促進する転写伸長因子であると同時にユビキチンリガーゼ (E3) の基質認識サブユニットとしても働く。本研究ではまず、伸長因子EloAの標的としてHox遺伝子を同定した。次いで、EloA-E3複合体の形成が、DNA傷害並びに α -amanitin等のPol II伸長阻害剤により促進されることを明らかにした。さらに、EloA-E3が細胞内でCSBと相互作用し、同会合がDNA傷害、 α -amanitin等で促進されること、CSBがEloA-E3のDNA傷害部位へのリクルートメントを促進すること等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Elongin A (EloA) performs dual functions as the transcriptionally active subunit of RNA polymerase II (Pol II) elongation factor Elongin and as the substrate recognition subunit of an ubiquitin ligase (E3) that ubiquitylates Pol II in response to DNA damage. In this study, we first identified Hox genes as the targets of elongation factor EloA. We also investigated the mechanisms governing conversion of the Elongin complex from its elongation factor to its E3 form. Assembly of EloA into the E3 was strongly induced by DNA-damaging agents; and α -amanitin, a drug that induces Pol II stalling; and by other various stimuli. In addition, we demonstrated (i) that EloA and the E3 subunit Cul5 associate in cells with the Cockayne syndrome B (CSB) protein, (ii) that this interaction was also induced by DNA-damaging agents and α -amanitin, and (iii) that CSB protein promotes stable recruitment of the EloA-E3 to sites of DNA damage.

研究分野：分子生物学

キーワード：Elongin CSB ユビキチンリガーゼ 転写伸長 RNAポリメラーゼII DNA傷害 ストレス 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

RNAポリメラーゼII(pol II)によるmRNAの転写は開始、伸長、終結、リサイクリングの4つの過程から成る。従来、転写開始が最も重要なステップと考えられてきたが、最近の技術革新により可能になったゲノムワイド解析の結果、実に3-4割の遺伝子の発現のON/OFFが伸長段階で決定されていることが判明し、伸長過程が一躍重要な制御の場としてクローズアップされてきた¹⁾。この過程の制御に関わる転写伸長因子はこれまで10種以上単離されているが、その内のいくつかはヒトの疾患病態と密接に関連する(p-TEFbとNELFは各々HIV、D型肝炎ウイルスの増殖と、また、相互転座によりMLLと融合タンパクを形成するELL、ENL、AF4等は急性白血病の発症と密接にリンクしている)ことが明らかとなり、転写伸長因子病という疾患概念が生まれている²⁾。

申請者らはこれまでにTFIIIF、EloAとそのファミリー(*Nature* 1992, *Science* 1995, *JBC* 2000, 2002)の4つの因子を単離してきた。TFIIIFが開始にも必須な基本因子であるのに対して、EloAの生理的意義は不明であったが、最近EloA^{-/-}型のマウス胎仔およびES細胞の神経系発生・分化能について解析した結果、同胎仔では脳、脊髄における感覚神経の形成の低下を、また同ES細胞ではレチノイン酸(RA)による神経分化ならびに一群の神経分化関連転写制御因子の発現の著明な低下を認め、EloAが神経堤細胞からの感覚神経への分化に促進的に作用していることが示唆された(*Cell Reports* 2012)。しかしながら、ChIP解析に有用な抗EloA抗体が存在しなかったためEloAの直接的な標的遺伝子の同定には至っていない。

さらに申請者らは、EloAがUV照射等の転写抑制刺激によりEloB/EloCを介してCullin5(Cu15)/Rbx2複合体と会合してEloA-E3複合体を形成し、pol IIの最大サブユニットであるRpb1をユビキチン(Ub)化してプロテアソームによる分解へと導くことも明らかにしている(*EMBO J.* 2008)。最近、EloA-E3複合体の形成を生細胞内でリアルタイムに解析するため、EloAとCu15を赤色と黄色の別々の蛍光タンパク質との融合タンパクの形で発現させて、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)解析によりUVレーザー照射あるいはpol II

伸長阻害剤である α -amanitin処理後の両因子の相互作用を経時的に追跡したところ、前者の場合は照射の1-2分後より、後者の場合も処理完了直後より両因子の会合が認められ、続いてRpb1の分解が生じることが判明した。非常に興味あることに、DNA損傷チェックポイント経路のインヒビターであるChk1(Checkpoint kinase 1)阻害剤を加えると、UV照射後のEloA、Cu15間の会合とRpb1の分解は著明に抑制されたのに対し、 α -amanitin処理後の両因子の会合とRpb1分解は抑制されないことが明らかとなった。これは、UV照射等のDNA傷害(+)型と α -amanitin処理等の傷害(-)型の転写抑制とでは、刺激後のEloA-E3複合体形成促進のメカニズムが異なることを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、転写伸長/E3因子EloAの神経分化制御における標的遺伝子の同定とDNA傷害(+)型並びに傷害(-)型の各種刺激後のEloAの伸長からE3への機能変換のメカニズムの分子レベルでの解明とを目指して、以下の課題に取り組む。

(1) マウスES細胞-神経分化誘導系で作製した胚様体および胎仔を用いてRNA-sequenceおよび抗EloA抗体並びに抗pol II抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequenceを実施し、神経分化促進に関わるEloAの標的遺伝子を同定する。

(2) DNA傷害(+)型並びにDNA傷害(-)型の刺激後のEloAのE3機能活性化に関わる因子を同定する。

(3) EloA-E3のDNA傷害部位へのリクルートメントを制御する因子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 神経分化制御におけるEloAの標的遺伝子の同定

1) 野生型およびEloA^{-/-}型のマウスES細胞をレチノイン酸(RA)非添加で4日、添加して4日の計8日間培養して形成させた胚様体からtotal RNAを調製(培養期間0、4、6、8日の4点)した。rRNA除去後、RNAを増幅してライブラリーを作製、超高速シーケンサーHiSeq 2000(Illumina)により塩基配列を決定して、EloA欠失によりRAによる発現増加が損なわれる遺伝子を特定した。

2) 上記(1)の ES 細胞-神経分化誘導系で野生型 ES 細胞を培養 5 日目以降 RA 添加あるいは非添加下で形成させた胚様体(培養 8 日後)を回収、ゲノム DNA とタンパク質をクロスリンクさせ断片化した後、抗 EloA 抗体並びに抗 pol II 抗体を用いて ChIP を実施した。脱クロスリンクして DNA を精製、ライブラリー作製の後、HiSeq 2000 により塩基配列を決定した。RA 添加により EloA 並びに Pol II の結合の増加が認められたものを EloA の標的遺伝子として同定した。

(2) 各種刺激後の EloA の E3 機能活性化並びに EloA-E3 の DNA 傷害部位へのリクルートメントに関わる因子の同定

EloA-E3 の構成因子をはじめとする各種タンパク質間の細胞内での相互作用の有無は、各タンパク質を、Halo-tag、mCherry、GFP 等との融合タンパクとして発現させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 神経分化制御におけるElongin Aの標的遺伝子の同定

野生型および $EloA^{-/-}$ 型のマウス ES 細胞をレチノイン酸 (RA) 非添加で 4 日間、次いで添加して 4 日間培養して胚様体を形成させた。培養開始前、開始後 4 日、6 日ならびに 8 日目の ES 細胞あるいは胚様体を回収し、ゲノム DNA とタンパク質をクロスリンクさせ断片化した後、抗 EloA 抗体並びに抗 pol II 抗体 (D8L4Y, rabbit monoclonal antibody) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。沈降物を脱クロスリンクした後 DNA を精製し、HiSeq 2000 により塩基配列を決定した。Input DNA を対照として解析した結果、 β -actin、GAPDH 等の housekeeping 遺伝子上には RA 添加の有無に関わらずほぼ同等の EloA 並びに pol II の集積が認められた。一方、homeobox 遺伝子群に属する *Hoxd* 等の遺伝子においては、RA 添加前はほとんど EloA の集積が認められないが、RA 添加後に遺伝子コーディング領域に著しい集積が認められることが判明した(図 1)。また、pol II については、 $EloA^{-/-}$ 型の胚様体では RA の添加前、添加後共に *Hoxd* のプロモーターから転写開始部位にかけて多量の集積が認められたのに対して、野生型の胚様体では RA 添加後に遺伝子のコーディ

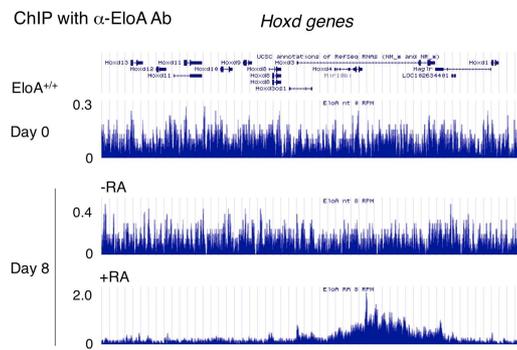


図1. RA刺激後に*Hoxd*遺伝子のコーディング領域に EloAの集積が認められる

ング領域から 3' 領域にかけて顕著な集積の増加が認められることが判明した(図 2)。以上の結果から、EloA が *Hoxd* 等の遺伝子において RA 刺激による pol II のプロモーターからの遊離と伸長反応の促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。

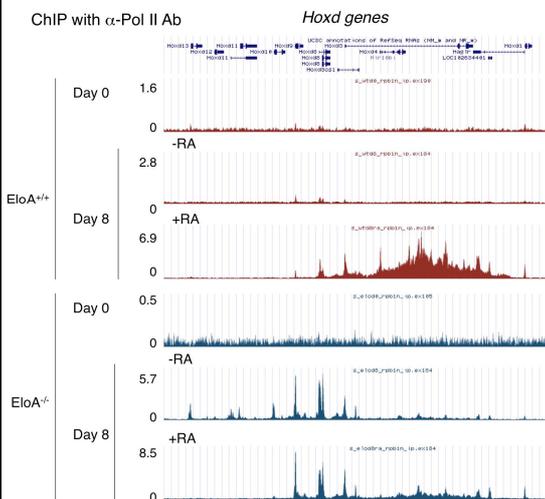


図2. pol IIはEloA^{-/-}胚様体ではRA刺激の有無に関わらず*Hoxd*遺伝子のプロモーター領域に集積するが、野生型胚様体ではRA刺激後に*Hoxd*のコーディング~3'領域に集積する

(2) DNA 傷害 (+) 型及び DNA 傷害 (-) 型刺激後の EloA の E3 機能活性化に関わる因子の同定

生細胞内で EloA-E3 複合体の形成を検証するため、EloA は Halo-tag と Cu15 は mCherry-tag との融合タンパクの形で発現させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法を用いて UV 照射等、各種刺激後に EloA と Cu15 とが相互作用することを確認した(図 3)。両因子間の会合は、UV 照射等の DNA 傷害刺激並びに α -amanitin、DRB 等の pol II 伸長阻害剤により促進された。また、EloA 依存性の転写を活性化することが知られている ER ストレス誘導剤 thapsigargin、栄養飢餓誘導剤 histidinol や RA の影響について調べたとこ

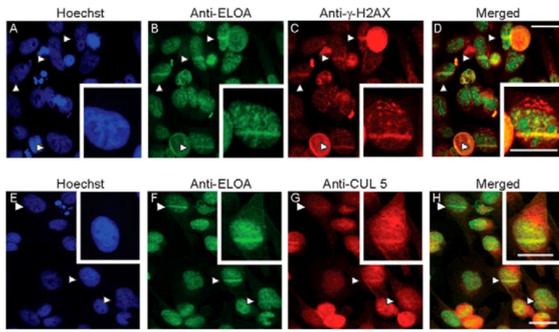


図3. UV-laser照射後にEloAとCul5はDNA傷害部位に集積する

る、何れの刺激も両因子の会合を有意に促進することが明らかとなった(図4)。さらに、UV照射後の両因子の会合がATMキナーゼ阻害剤のKU60019により抑制されたのに対して、その他の刺激後の会合は抑制されないことが判明し、DNA非傷害型の刺激はDNA傷害型とは異なる経路でE3複合体の形成を促進することが示唆された(図4)。

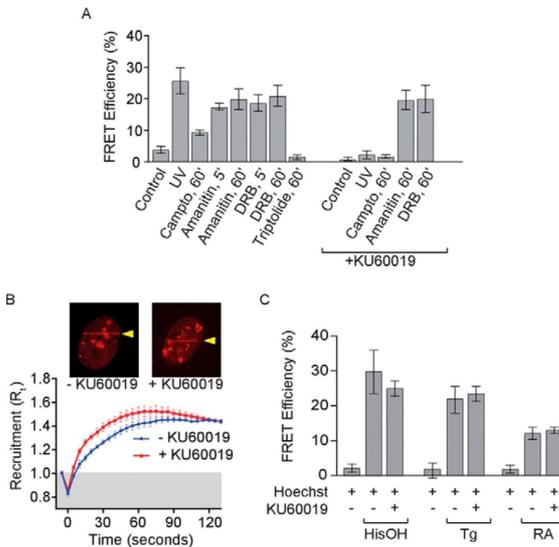


図4. 各種刺激によるEloA-E3形成の促進とKU60019のDNA傷害型刺激に限定的な抑制作用

(3) EloA-E3のDNA傷害部位へのリクルートメントを制御する因子としての Cockayne syndrome B (CSB) タンパクの同定

EloA-E3とCockayne syndrome B (CSB) タンパクとの細胞内での結合性の有無を検証するため、EloA、Cul5はそれぞれ Halo-tag、mCherryと、CSBはGFPとの融合タンパクとして発現させ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法を用いてこれら因子間の相互作用について解析した。その結果、EloA及びCul5とCSBとの会合が、各種DNA傷害刺激(camptothecin, etoposide, methylmethanesulfonate, aphidicolin,

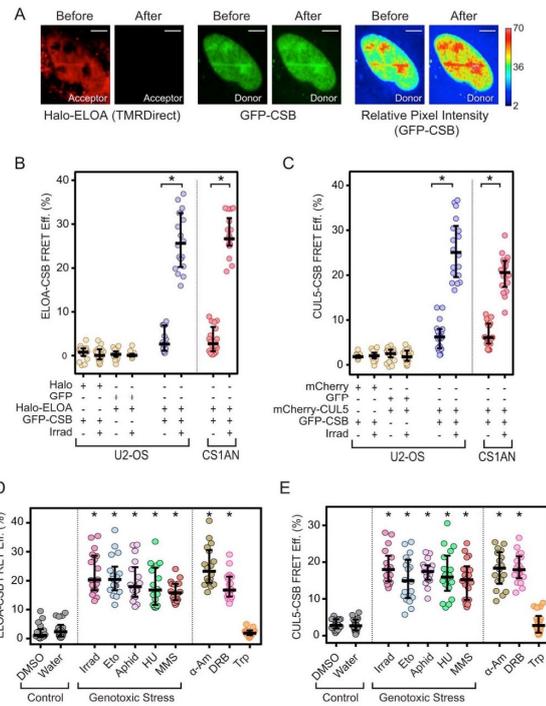


図5. 各種刺激によりEloAとCSBとの相互作用が促進される

hydroxyurea等)並びに α -amanitin、DRB等のpol II伸長阻害剤により顕著に促進されることが判明した(図5)。また、UV照射刺激後のEloAとCul5間の会合がCSBの存在により顕著に促進されること、さらには、EloA-E3が細胞内のDNA傷害部位にリクルートされるのにCSBの存在が必須であること等を明らかにした(図6)。続いて、EloAの各

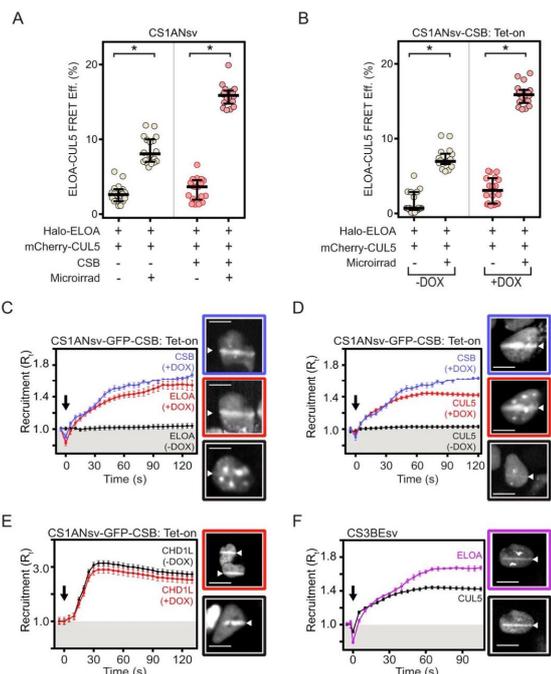


図6. CSBはEloAとCul5のDNA傷害部位への集積を促進する

種欠失変異体を用いてEloA-CSB間或いは

EloA-Cu15 間の結合性と DNA 傷害部位へのリクルートメントとの関連について解析した。その結果、EloA-CSB 間の結合性とリクルートメントの間には相関が認められたが、EloA-Cu15 間については、EloA の BC box 欠失変異体のように Cu15 との結合性は喪失するもののリクルートメントには異常をきたさないものが存在することが判明した(図7)。以上より、EloA は Cu15 と E3 複合体を形成するより以前に DNA 傷害部位にリクルートされ得ると考えられた。

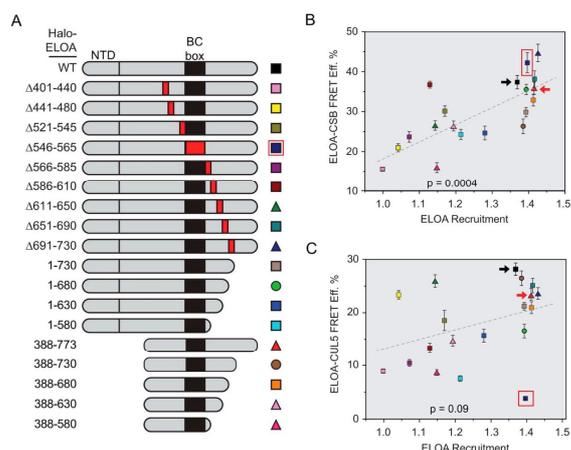


図7. EloAのDNA傷害部位への集積にはEloA-Cu15間ではなくEloA-CSB間の結合性が重要である

<引用文献>

- 1) Core LJ, Lis JT, et al. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845-1848, 2008.
- 2) Conaway JW, and Conaway RC. Transcription elongation and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 301-319, 1999.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Weems J.C., Slaughter B.D., Unruh J.R., Boeing S., Hall S.M., McLaird M.B., Yasukawa T., Aso T., Svejstrup J.Q., Conaway J.W., and Conaway R.C. Cockayne syndrome B protein regulates recruitment of the Elongin A ubiquitin ligase to sites of DNA damage. *J. Biol. Chem.* 査読有, Vol. 292, No. 16, 2017, pp. 6431-6437. doi: 10.1074/jbc.C117.777946.

Weems J.C., Slaughter B.D., Unruh J.R., Hall S.M., McLaird M.B., Gilmore J.M., Washburn M.P., Florens L., Yasukawa, T., Aso, T., Conaway, J.W., and Conaway, R.C.

Assembly of the Elongin A ubiquitin ligase is regulated by genotoxic and other stresses.

J. Biol. Chem. 査読有, Vol. 290, No. 24, 2015, pp. 15030-15041. doi: 10.1074/jbc.M114.632794.

[学会発表](計1件)

安川 孝史, 麻生 悌二郎, 他、ChIP-sequence 解析を用いた転写伸長因子 Elongin A の標的遺伝子の同定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fg_chmst/research.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻生 悌二郎 (ASO, Teijiro)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：20291289

(2) 連携研究者

北嶋 繁孝 (KITAJIMA, Shigetaka)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：30186241