

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590311

研究課題名（和文）Elongin 複合体のストレス応答における役割と作用機構の解明

研究課題名（英文）Role and mechanism of action of mammalian Elongin A in the stress response

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

研究成果の概要（和文）：Elongin A は RNA ポリメラーゼ II に対する伸長促進活性とユビキチン化(E)活性とを併せ持つが、両機能の *in vivo* における役割は不明であった。最近我々は、Elongin A が *HSP70*、*ATF3* 等のストレス応答遺伝子の発現に必須であることを明らかにした。そこで、本研究では Elongin A の 2 つの機能を選択的に欠損した変異体を作製して、Elongin A ノックダウン細胞に対する救済実験を行い、Elongin A の伸長促進機能が上記ストレス遺伝子の発現誘導に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Elongin A increases the rate of RNA polymerase II (pol II) transcript elongation by suppressing transient pausing by the enzyme. Elongin A also acts as a component of a ubiquitin ligase (E3) that can target stalled pol II for ubiquitylation and proteasome-dependent degradation. It is not known whether these activities of Elongin A are functionally interdependent *in vivo*. Here, we demonstrate that Elongin A-knockdown cells exhibit defects in the stress-inducible expression of *HSP70* and *ATF3* genes. Moreover, we identify Elongin A mutations that selectively inactivate one or the other of the above activities, and show that the elongation stimulatory, but not pol II ubiquitylation, activity of Elongin A is required to support the response of stress genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Elongin、転写伸長因子、ユビキチンリガーゼ、ストレス応答、発現制御、RNA ポリメラーゼ II

1. 研究開始当初の背景

DNA を鋳型とした mRNA の転写は RNA ポリメラーゼ II (pol II) によって触媒されるが、この反応は開始、伸長、終結、リサイクリングの4つのステップから成る。転写開始が遺伝子発現における主要な制御段階であることは以前から知られていたが、最近これに続く伸長段階も、反応が途中で停止し易いこと、巨大な遺伝子では全長の転写に一日近くを要することなどから、重要な制御の場であることが認識されてきた。これまでに、この段階を正または負に制御する転写伸長因子が20個程単離されているが、その内のいくつかはヒトの疾患病態と密接に関連することが明らかとなり (CSB の活性低下は Cockayne 症候群の発症原因となり、P-TEFb や NELF の作用は各々 AIDS や D 型肝炎の病態と密接に関連することが報告されている。)、転写伸長因子病という疾患概念が生まれつつある (Shilatifard, Conaway et al. *Annu. Rev. Biochem.* 2003)。

申請者もこれまでに TFIIIF、Elongin A、同因子のファミリーに属する Elongin A2 および A3 の4つの伸長因子を単離して解析を行ってきた (Aso et al. *Nature* 1992, Aso et al. *Science* 1995, Aso et al. *JBC* 2000, Yamazaki, Aso et al. *JBC* 2002) が、TFIIIF が普遍的因子であるのに対して、Elongin A は限定された遺伝子の転写に関わることが明らかになっている (Yamazaki, Aso et al. *JBC* 2003)。Elongin A についてはノックアウトマウスを作製したが、ホモ欠失マウスは全身性の低形成により胎生 10.5 日頃に致死となり、同胎仔由来の MEF はアポトーシス亢進、早期細胞老化等、ストレス耐性の低下を示唆する表現型を示した (Miyata, Aso et al. *Cell Death Differ.* 2007)。そこで、代表的なストレス応答遺伝子である HSP70、ATF3 の発現への関与について検討したところ、Elongin A が両遺伝子の発現誘導に必須であることが判明した。また、Elongin B と C は最初 Elongin A の伸長活性促進因子として単離された (Duan, Aso et al. *Science* 1995,

Aso et al. *EMBO J.* 1996) が、その後 VHL 癌抑制蛋白複合体をはじめとするユビキチンリガーゼ (E3) 複合体において基質認識サブユニットと Cullin/Rbx とのアダプター役を務めることが明らかとなった (Aso et al. *BBRC* 2000, Conaway et al. *Science* 2002)。そのため、果たして Elongin A も E3 の基質認識サブユニットとして機能するのか、その場合、標的基質は何かに興味をもたれていたが、最近になって申請者らは UV 刺激後に Elongin A が Elongin BC を介して Cul5/Rbx2 と会合し、pol II をユビキチン化して分解へと導くことを発見した (Yasukawa, Aso et al. *EMBO J.* 2008)。

以上から申請者らは、HSP70、ATF3 等のストレス応答遺伝子の発現誘導に際しては、Elongin A 複合体 (Elongin ABC または Elongin ABC-Cul5/Rbx2) が転写活性化因子、メディエーター等を介して当該遺伝子のプロモーター-コーディング領域にリクルートされ、同複合体が pol II に対しても伸長促進あるいは E3 機能を発揮して転写の活性化に寄与するのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、Elongin A 複合体が pol II に対しても2つの制御機能 - 伸長促進ならびにユビキチンリガーゼ (E3) 機能 - がストレス応答において果たす役割とその作用機構の解明を目指して、以下の課題に取り組む。

(1) 伸長促進ならびに E3 機能に必要な Elongin A 配列の決定

各種変異型 Elongin A を作製して pol II 伸長促進ならびに E3 活性に必要な配列について解析し、[伸長活性+, E3 活性-]、[伸長活性-, E3 活性+]ならびに[伸長活性-, E3 活性-]の変異体を同定する。

(2) ストレス応答遺伝子発現における Elongin A 複合体の役割の解析

HSP70、ATF3 の発現誘導に Elongin A が必須であることを最近見出した。そこで、両ストレス応答遺伝子の発現における Elongin A

の伸長、E3 各機能の役割を明らかにするため、RNAi により Elongin A をノックダウンして両遺伝子の応答を欠如させた HeLa 細胞に野生型あるいは上記(1)で同定した3種の変異型 Elongin A を戻して、両遺伝子の発現誘導が救済されるかどうか調べる。

3. 研究の方法

(1) 伸長促進ならびに E3 機能に必要な Elongin A 配列の決定

作製した点変異および欠失変異型の Elongin A をバキュロウイルスの系を用いて Elongin B、Elongin C、HA-Cul5、Rbx2 と昆虫細胞で共発現させ、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降により変異型 Elongin A と Cul5 との結合能について調べた。同時に上記の免疫沈降物が pol II に対する E3 活性を有するかどうかを試験管内ユビキチン化アッセイにより解析した。また、作製した変異型 Elongin A の Elongin BC 存在下での転写伸長活性の有無を精製タンパクと tailed template とを用いた試験管内転写伸長アッセイにより解析した。

(2) ストレス応答遺伝子発現における Elongin A 複合体の役割の解析

HSP70、ATF3 等のストレス応答遺伝子の発現における Elongin A の伸長促進活性ならびに E3 活性の役割を明らかにするため、先ず RNAi により Elongin A をノックダウンして HSP70、ATF3 の発現誘導がかからなくなった HeLa 細胞を作製した。次いで、これに Flag タグを付加した Elongin A 変異体 (上記1で同定した3種類)あるいは野生型 Elongin A (RNAi 抵抗性にするため rat Elongin A cDNA を使用)を導入して、HSP70、ATF3 の発現誘導が救済されるかどうかを調べた。この際、RT-PCR により HSP70、ATF3 遺伝子の発現レベルを解析すると同時に、抗 Flag および抗 pol II 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を実施し、ストレス刺激前後での Elongin A と pol II の当該遺伝子上での局在性の変化について解析した。

4. 研究成果

(1) 伸長促進ならびに E3 機能に必要な Elongin A 配列の決定

Elongin A の BC-box の下流には、 $\phi xxLP\phi Pxx\phi xx [Y/F] [L/I]$ をコンセンサス配列とする Cul5-box が存在し、E3 複合体の形成に重要と考えられている (図1)。以前我々は、BC-box、Cul5-box の両方を含むアミノ酸 521-680 の配列が Elongin A の pol II に対する

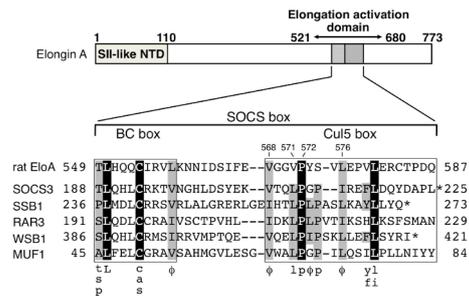


図1

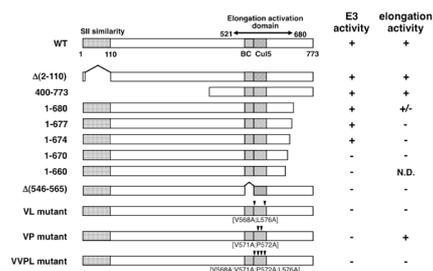


図2

伸長促進ならびにE3機能に必要なことを報告している (Aso et al. *EMBO J.* 1996, Yasukawa, Aso et al. *EMBO J.* 2008)。今回、Elongin A の伸長機能とE3機能とが分離可能かどうか調べるため、新たにElongin A[V571A;P572A] (Elongin A-VP)、Elongin A[V568A;L576A] (Elongin A-VL)、Elongin A[V568A;V571A;P572A;L576A] (Elongin A-VVPL) の3つのCul5-box点変異体と、Elongin A(1-677)、Elongin A(1-674)、Elongin A(1-670)、Elongin A(1-660)の4つのC末欠失体を作製した (図2)。先ずE3複合体の形成について解析した結果、Elongin A-VP、Elongin A-VL、Elongin A-VVPLの3つのCul5-box点変異体の何れもが複合体形成能を失うことが判明した (図3)。次に、pol II

を標的としたE3機能について解析した結果、上記3つのCul5-box点変異体に加えて、Elongin A(1-670)、Elongin A(1-660)の2つ

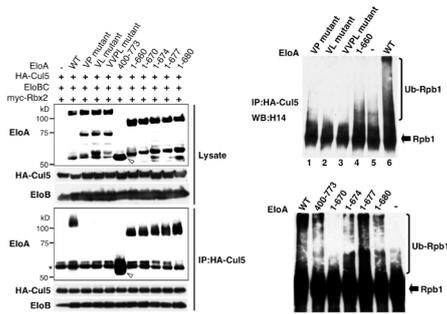


図3

を確認し、〔伸長活性+, E3 活性-〕型Elongin Aでもレスキュー可能であることを見出した。さらに、Doxorubicin 処理によるDNA 傷害や heat shock 等の刺激により、Elongin Aが *ATF3* ならびに *HSP70* の転写領域

(プロモーター部位からコーディング領域、3' 非翻訳領域にかけて) にリクルートされ、RNAポリメラーゼ II と協働してこれら遺伝子の発現誘導を制御することが Elongin A と RNA ポリメラーゼ II (total pol II、CTD-Ser2リン酸化型 pol II および CTD-Ser5 リン酸化型 pol II) に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析により明らかとなった。尚、当該機能にも Elongin A の伸長促進活性が重要であり、E3 活性は不要であることが判明した (Kawauchi J, et al. 投稿準備中)。

のC末欠失体がE3活性を失うことが判明した (図4)。さらに、pol IIの転写伸長促進活性について解析した結果、Elongin A-VL、Elongin A-VVPLのCul5-box点変異体に加えて、Elongin A(1-677)、Elongin A(1-674)、Elongin A(1-670) のC末欠失体が伸長促進活性を失うことが判明した (図5)。

図4

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1件)

- ① Yamada K, Tamamori-Adachi M, Goto I, Iizuka M, Yasukawa T, Aso T, Okazaki T, and Kitajima S. Degradation of p21^{Cip1} through APC/C^{Cdc20} mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin dependent kinase 2 in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 査読有 Vol. 286, 2011, 44057-44066

〔学会発表〕 (計5件)

- ① 安達(玉盛) 三美, 他、CDK2 が心筋細胞における APC/C^{Cdc20} ユビキチンリガーゼを介する p21 のユビキチン化を抑制する、第33回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② Takashi Yasukawa, et al、Transcriptional elongation factor Elongin A regulates retinoic acid-induced gene expression during neuronal differentiation of embryonic stem cells. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ Makoto Inoue, et al、ストレス反応における mammalian Elongin A の特徴と役割、第33回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

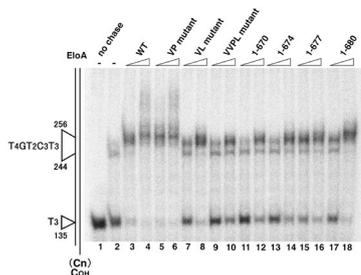


図5

以上の解析の結果、Elongin Aの伸長機能とE3機能とは分離可能なことが判明し、〔伸長活性-, E3活性+〕型の変異体としてElongin A(1-677)、Elongin A(1-674)を、〔伸長活性+, E3活性-〕型の変異体としてElongin A-VPを同定できた (図2) (Yasukawa T, et al. 投稿中)。

(2) ストレス応答遺伝子発現におけるElongin A複合体の役割の解析

HSP70、*ATF3* 等のストレス応答遺伝子の発現に ElonginA が必須であることを見出した。*ATF3* 発現誘導の回復に関しては、Elongin A をノックダウンしたヒト細胞への野生型 rat Elongin A 再導入によるレスキュー

- ④ 安川孝史, 他, Elongin A 複合体による RNA polymerase II ポリユビキチン化の制御、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑤ Aso T. et al, Mammalian Elongin A complex mediates DNA-damage-induced ubiquitylation and degradation of Rpb1. ASBMB 2009, April 22, 2009, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fg_chmst/researchi.htm

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