

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870534

研究課題名(和文)新規転写共役修復因子UVSSAの精製と生化学的解析

研究課題名(英文) Purification and biochemical analysis of a novel transcription nucleotide excision repair factor UVSSA

研究代表者

郭 朝万 (GUO, Chaowan)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号：70645283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写と共に働くヌクレオチド除去修復(TC-NER)は、転写中のDNA鎖上のDNA損傷を除去することができる修復機構である。私たちは、TC-NER欠損性疾患である、紫外線高感受性症候群(UVSS)の新規責任遺伝子としてUVSSAを同定した。UVSSAはCS複合体(CSA/CSB)の安定性制御や、損傷箇所で停止した転写型RNA pol IIのユビキチン化制御に重要であることが示唆された。しかし、このユビキチン化とTC-NER開始反応との関連性が未だ不明瞭である。本研究では、UVSSAの機能解析により、DNA損傷時のRNA pol IIの機能的な修飾の生理学的意義を解明することを目指した。

研究成果の概要(英文)：Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair (TC-NER) resolving the transcription-blocking DNA damages from our genome. Defective in TC-NER causes two genetic diseases, Cockayne syndrome (CS) and UV-sensitive syndrome (UVSS). CS patients usually exhibit photosensitivity, neurological degeneration and severe developmental defects, while UVSS patients are only sensitive to sunlight and display mild clinical features. In previous study, Nakazawa et al. identified the UVSSA gene as the responsible gene of UVSS, which encoded a novel TC-NER factor UVSSA that interacts with TC-NER machinery and stabilizes the CS complex. UVSSA also facilitates ubiquitination of RNA polymerase II that stalled at DNA damage sites. Recent reports shown that the ubiquitination may involve in regulation of TC-NER, thus we aimed to uncover the roles of UVSSA in RNA polymerase II ubiquitination during the initiation step of TC-NER, then provide more insights into the processing of stalled RNA polymerase.

研究分野：機能生物化学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 紫外線高感受性症候群 UVSSA RNAポリメラーゼII ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair, NER) は、生体において最も多能な DNA 修復システムであり、紫外線や環境変異原による様々な DNA 損傷を DNA 鎖から除去する。NER は、DNA 損傷を認識する過程の違いにより、全ゲノム NER (Global Genome NER: GG-NER) と RNA 転写と共役した NER (Transcription coupled NER: TC-NER) の 2 つのサブパスイに分類される。TC-NER は、転写されている DNA 鎖上に存在する損傷を効率的に修復することで、正常な遺伝子発現制御に関わっている重要な修復機構である。ヒトにおいて TC-NER の先天異常は、コケイン症候群 (Cockayne 's Syndrome: CS) や紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive Syndrome: UV^SS) などの遺伝病の原因となる。興味深い点は、UV^SS と CS 患者由来の細胞は、ともに TC-NER 活性が完全に欠損しているが、両者の臨床症状は大きく異なっている事である。CS では DNA 損傷により正常な遺伝子転写も阻害されるため、日光過敏症以外に、神経症状、早老症や発達障害などを発症すると考えられる。これに対して、UV^SS は軽微な日光過敏症以外に重篤な症状は見られない。この損傷応答反応と臨床症状との不一致の原因は依然として不明である。2012 年、研究代表者が所属する研究グループは、UV^SS の新規責任遺伝子として *UVSSA/KIAA1530* を同定した (Nakazawa *et al.* 2012)。UVSSA タンパク質は、CS 複合体 (CSA/CSB) とともに転写型 RNA ポリメラーゼ IIo (RNA Polymerase IIo; RNA pol IIo) のユビキチン化による安定性制御に関わっており、TC-NER の正常な進行に重要であることが示された。これまでの研究報告より、DNA 鎖上で転写を進めている RNA pol IIo は、

紫外線によって生じた DNA 損傷 (CPD, 6-4 photoproduct など) 部位にさしかかると、転写を停止することが示唆されている。RNA pol IIo が長い時間停滞すると、細胞周期の停止やアポトーシスを誘導すると考えられる。そのため、停止した RNA pol IIo は、CS 複合体の作用により一旦後方へ待避することで、DNA 損傷部位を開放し、TFIIH 等の修復因子のリクルートを進めるモデルが示されているが、本 TC-NER 開始反応の詳細な分子機構は、未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、生化学、分子生物学、細胞生物学など様々な研究アプローチを用いて、UVSSA の機能解析を実施する。損傷箇所では停止した RNA pol IIo のユビキチン化における UVSSA の詳しい役割、そして RNA pol IIo のユビキチン化修飾と TC-NER 開始反応との関連性を解明することを目指した。

3. 研究の方法

目的を達成するために、以下の 2 点の研究に取り組んだ。

1) RNA pol IIo のユビキチン化における UVSSA の役割及び作用機序を検討するため、UVSSA や既知の TC-NER 関連タンパク質の精製を行い、試験管中での RNA pol IIo のユビキチン化再構成反応系の確立を目指す。さらに、このユビキチン化修飾過程における UVSSA と各 TC-NER 因子の相互作用機序を調査する。

2) DNA 損傷後の TC-NER の進行における UVSSA の機能と RNA pol IIo との関係をもより詳細に解析するため、緑色蛍光タンパク質を融合した RNA pol IIo (GFP-RNA pol IIo) の安定発現細胞株の樹立に取り組み、これを用いて、経時的に RNA pol

IIo を観察するシステムの確立を目指した。確立後、蛍光退色回復法 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) により、GFP-RNA pol IIo の DNA 損傷箇所での滞留時間を、紫外線照射後の健常人、UV^s 患者、CS 患者由来細胞において詳細に調査した。

4. 研究成果 リコンビナント UVSSA 及び TC-NER 関連タンパク質の精製

TC-NER 機構における UVSSA の役割を生化学的な視点で解析するため、リコンビナント UVSSA タンパク質や各種 TC-NER 開始反応に関連する因子を精製した。生物活性を持つ、高純度な RNA pol II 複合体は、HeLa-FH3 細胞株 (RPB3-His-Flag の安定発現細胞株) を用いて大量に精製した。一方、野生型 UVSSA と変異型 UVSSA-C32R (UV^s 患者由来細胞で過剰発現させても TC-NER 活性を回復できず、さらに RNA pol IIo ユビキチン化によるバンドシフトも検出されない変異体)、CSA/CSB 複合体及び NER 調節因子の TFIIH 複合体については、昆虫細胞/バキュロウイルスシステムを用いて、精製した。以上により、本研究の核心である *in vitro* ユビキチン化再構成反応系の準備が整った。

ユビキチン化再構成実験系の構築

TC-NER における UVSSA の分子機能を生化学的に解析するため、精製した UVSSA、RNA pol II 複合体、各種 TC-NER 因子及び市販の精製ユビキチンリガーゼ (E1/E2/E3)、ユビキチンなどを加えることで、試験管内で RNA pol II の *in vitro* ユビキチン化反応の再現を試みた。

RNA pol IIo のユビキチン化と TC-NER 進

行反応との関連性解析

これまで幾つかの研究報告により、RNA pol IIo 複合体は DNA 損傷箇所では停止した後、RNA pol II 複合体中最も大きな機能性サブユニットの RPB1 が、Lys6, Lys48 または Lys63 を介した複雑なポリユビキチン修飾を受けて、分解などの機能性制御を受ける可能性が示唆されている。Nakazawa らの研究より、正常細胞、UV^s 細胞や CS 細胞において、DNA 損傷条件下での RPB1 のユビキチン化状況及び安定性が大きく異なると予測された。つまり、正常細胞では、Lys63 位を介してユビキチン化によるバンドシフトが検出されており、UV^s 細胞では、正常細胞で見られたポリユビキチン化が観察されず、RPB1 は Lys48 位を介してポリユビキチン化され経時的に分解すると予測された。これに対して、CS 細胞では RPB1 のポリユビキチン化も分解も起らないと考えられた。これらのことから、損傷条件下における RNA pol IIo のユビキチン化は TC-NER 開始反応に重要であり、UVSSA は CS 複合体とともに RNA pol IIo をユビキチン化に導くが、UVSSA が欠損した状態では CSA/CSB 複合体のみによるユビキチン化が起き、RNA pol IIo の分解につながると予測された。本モデルを検証するため、樹立した GFP-RPB1 の安定発現細胞を用いて、紫外線照射後の RNA pol IIo の分解・滞留時間を調査した。その結果、損傷 DNA 鎖上における RNA pol IIo の滞留時間が、正常細胞、CS 細胞、UV^s 細胞において異なること (滞留時間は CS 細胞で最も長く、次いで正常細胞、UV^s 細胞であった) が示された。UV^s 患者細胞と CS 患者細胞での RNA pol IIo の停止期間の長さの違い、つまり正常な転写が阻害される期間の違いは、UV^s と CS の臨床症状が大きく異なる原因である可能性が示唆された。

今後、RNA pol II α の損傷部位における停止と転写阻害を検証し、UV^s と CS の病態の違いとの関連を明らかにしていくとともに、ユビキチン化再構成系を応用し、DNA 損傷後の RNA pol II α の詳細なユビキチン化反応を調査することで、上記モデルの検証を進める。

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8件)

1. Nan Jia, Yuka Nakazawa, Chaowan Guo, Mayuko Shimada, Mieran Sethi, Yoshito Takahashi, Hiroshi Ueda, Yuji Nagayama, Tomoo Ogi, A rapid, comprehensive system for assaying DNA repair activity and cytotoxic effects of DNA-damaging reagents. *Nature Protocols*, 10, 12-24, (2015), 査読有, doi: 10.1038/nprot.2014.194.
2. Chongchao Wu, Wei Chen, Jia Chen, Bo Han, Zhou Peng, Feng Ge, Bo Wei, Mingxian Liu, Meiyang Zhang, Chuiwen Qian, Zhibo Hou, Ge Liu, Chaowan Guo, Yifei Wang, Kaio Kitazato, Guoying Yu, Chunbin Zou, Sheng Xiong. Preparation of monoPEGylated Cyanovirin-N's derivative and its anti-influenza A virus bioactivity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biochemistry*, 157, 1-10, (2015), 査読有, doi:10.1093/jb/mvv013.
3. Jia Chen*, Dane Huang*, Wei Chen*, Chaowan Guo*, Bo Wei, Chongchao Wu, Zhou Peng, Jun Fan, Zhibo Hou, Yongsheng Fang, Yifei Wang, Kaio Kitazato, Guoying Yu, Chunbin Zou, Chuiwen Qian and Sheng Xiong. Linker-Extended Native Cyanovirin-N Facilitates PEGylation and Potently Inhibits HIV-1 by Targeting the Glycan Ligand. *PLOS one*, 9, e86455, (2014), *equal contribution, 査読有 doi: 10.1371/Journal.pone.0086455.
4. Ge Liu, Yangfei Xiang, Chaowan Guo, Ying Pei, Yifei Wang, Kaio Kitazato. Cofilin-1 is involved in regulation of actin reorganization during influenza A virus assembly and budding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, 821-825, (2014), 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.036.
5. Hu Ge, Ge Liu, YangFei Xiang, Yu Wang, Chaowan Guo, Nanhao Chen, YingJun Zhang, YiFei Wang, Kaio Kitazato, and Jun Xu. Poly-galloyl-glucose acts as "molecular glue" to prevent influenza A virus entry into host cells. *PLOS one*, 9, e94392, (2014), 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0094392.
6. Lan Luo, Miho Kawakatsu, Chaowan Guo, Yoshishige Urata, Wenjing Huang, Haytham Ali, Hanako Doi, Yuriko Kitajima, Takayuki Tanaka, Shinji Goto, Yusuke Ono, Hongbo Xin, Kimikazu Hamano and Taosheng Li. Effect of antioxidants on the quality and genomic stability of induced pluripotent stem cells, *Scientific Reports*, 4, 1-7, (2014), 査読有, doi: 10.1038/srep03779.
7. Kazuya Kashiya*, Yuka Nakazawa*, Daniela T. Pilz*, Chaowan Guo*, Mayuko Shimada, Kensaku Sasaki, Heather Fawcett, Jonathan F. Wing, Susan O. Lewin, Lucinda Carr, Taosheng Li, Koh-ichiro Yoshiura, Atsushi Utani, Akiyoshi Hirano¹, Shunichi Yamashita, Danielle Greenblatt, Tiziana Nardo, Miria Stefanini, David McGibbon, Robert Sarkany, Hiva Fassihi, Yoshito

Takahashi, Yuji Nagayama, Norisato Mitsutake, Alan R. Lehmann, and Tomoo Ogi. Malfunction of the ERCC1/XPF endonuclease results in diverse clinical manifestations and causes three nucleotide excision-repair-deficient disorders, Cockayne Syndrome, xeroderma pigmentosum and Fanconi Anemia. *The American Journal of Human Genetics*, 92, 807-819, 2013. *equal contribution. 査読有, doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.007.

8. **Chaowan Guo**, Miho Kawakatsu, Marie Idemitsu, Yoshishige Urata, Shinji Goto, Yusuke Ono, Tao-Sheng Li. Culture under low physiological oxygen conditions improves the stemness and quality of induced pluripotent stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 228 (11), 2159-2166, 2013. 査読有, doi: 10.1002/jcp.24389.

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 第37回日本分子生物学会年会

郭朝万、中沢由華、嶋田繭子、賈楠、唐田清伸、宮崎仁美、荻朋男

Molecular and functional study on the initiation of transcription coupled nucleotide excision repair.

2014年11月25日～2014年11月27日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

- 2) 3R Symposium

郭朝万(Guo Chaowan)

Molecular characterization and functional analysis of XRCC4, a novel pathological gene for radiation sensitivity and developmental abnormalities.

2014年11月17日～2014年11月21日

御殿場高原ホテル(静岡県御殿場市)

〔図書〕(計1件)

荻朋男, 中沢由華, 佐々木健作, **郭朝万**, 吉浦孝一郎, 宇谷厚志, 永山雄二. 紫外線高感受性症候群責任因子UVSSAの分子機能解析. 生化学 85, 日本生化学会, 133-144 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郭朝万(GUO, Chaowan)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・客員研究員

研究者番号: 70645283

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし