

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22131009

研究課題名（和文）転写共役修復とタンパク質リモデリング

研究課題名（英文）Transcription-coupled repair and protein remodeling

研究代表者

田中 亀代次（TANAKA, Kiyoji）

大阪大学・生命機能研究科・特任教授

研究者番号：80144450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 99,900,000円

研究成果の概要（和文）：転写を阻害する鋳型鎖上のDNA損傷を迅速に除去し転写を回復させる「転写と共役したヌクレオチド除去修復」(TC-NER)機構の解析を行った。すなわち、(1) 転写阻害されたRNAポリメラーゼII最大サブユニットがCSA複合体によってユビキチン化されることがTC-NERに必須である。(2) 新規TC-NER因子UVSSA-USP7複合体は、CSBの安定化ひいては転写の回復に必須である。さらに、(3) NER因子XPG、XPDの新規機能を明らかにした。XPGは前初期遺伝子FOSやハウスキーピング遺伝子EEF1A1の転写に必須であり、XPDはMMS19などと新規複合体を形成し染色体分配に関与する。

研究成果の概要（英文）：We examined molecular mechanism of transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER) that quickly removes transcription-blocking DNA damage on the transcribed strands, and leads to resumption of transcription after DNA damage. We found that (1) Ubiquitylation of the largest subunit of RNA polymerase II by the CSA complex is indispensable for TC-NER. (2) Novel TC-NER factor, UVSSA-USP7 complex, is required for protection of CSB from proteasome-mediated degradation after UV-irradiation, leading to resumption of transcription. (3) We revealed novel functions of NER factors, XPG and XPD. XPG is required for transcription elongation of primary response gene FOS and house keeping gene EEF1A1, and XPD is included in the novel protein complex, named as MMXD, which is involved in chromosome segregation.

研究分野：分子生物学、人類遺伝学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 転写と共役した修復 色素性乾皮症 コケイン症候群 紫外線高感受性症候群
ユビキチン化 SUMO化 初期応答遺伝子

1. 研究開始当初の背景

細胞内で DNA は様々な外的・内的要因により絶えず損傷を受けている。それらの損傷の多くは、DNA の複製や転写を阻害し、突然変異やゲノムの不安定性を引き起こし、ひいては細胞死や癌化の原因となる。ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) は、UV により生じるピリミジンダイマーや嵩の高い化学物質の付加体など DNA の二重らせん構造を歪ませる損傷を除去し修復する機構である。NER には 2 つの経路: 「ゲノム全体の修復」 (global genome NER; GG-NER) と 「転写と共役した修復」 (transcription-coupled NER; TC-NER) が存在する。GG-NER は、ゲノム上のどの場所の DNA 損傷でも除去するのに対し、TC-NER は、転写が行われている遺伝子の鋳型鎖上の DNA 損傷を、非転写鎖上や転写されていない領域にある損傷よりも迅速に除去する。鋳型鎖上の損傷は、RNA ポリメラーゼ II の進行を阻害し細胞死を誘発するので、そのような状況を回避し転写を迅速に回復させる役割があると考えられる。2 つの経路では、損傷の認識などの初期過程は異なっているが、途中からは共通の NER 因子が働き、同じ修復反応が進行する。ヒトの GG-NER では色素性乾皮症 C 群タンパク質 (XPC) 複合体、DDB2 複合体が損傷認識因子として働く。我々は、DDB2 が損傷 DNA 結合活性とユビキチンリガーゼ活性を持つ DDB2-DDB1-Cu14A-Roc1 複合体を形成することを明らかにした。一方、TC-NER では、転写伸長中の RNA ポリメラーゼ II (Po1 II) が損傷部位で停止することがその引き金になると考えられている。TC-NER 特異的因子として、TC-NER を欠損した遺伝性疾患であるコケイン症候群 (CS) の原因遺伝子産物 CSA、CSB が明らかになっており、これらの因子が損傷の認識や NER 共通因子の損傷部位への導入に関与すると考えられる。我々は、(1) UV 照射した細胞では、CSA、CSB に依存的に、Po1 II の最大サブユニット (RPB1) のポリユビキチン化が起こる。(2) UV 照射後、CSA が CSB 依存的に核マト

リクス画分に移行し、Po1 II と結合する。

(3) CSA が DDB2 と同様に CSA-DDB1-Cu14A-Roc1 というユビキチンリガーゼ複合体を形成し、RPB1 および CSB を試験管内でユビキチン化する、という結果を得ており、TC-NER の初期過程においても GG-NER と同様に因子間の相互作用とユビキチン化が重要な役割を担っていると考えられた。(4) その一方で、CS の臨床症状を NER 異常のみで説明することは困難である。NER 因子が DNA 修復以外の細胞内機能、とりわけ転写反応と深く関係していることに起因するのではないかと考えられる。我々はこれまでに XPG タンパク質がホルモンレセプターを介した転写の活性化に関与することを報告したが、XPG がより広範な転写反応に関与する可能性を検討した。さらに、XPD 遺伝子の突然変異によって、XP や XP/CS に加え、硫黄欠乏性毛髪発育異常症 (TTD) が発症する。XPD タンパク質は NER と転写開始に機能することが知られているが、これら 2 つの機能のみでは、XPD の変異で発症する XP、CS、TTD の 3 種類すべての遺伝疾患の症状と発生機序を説明することは困難である。

2. 研究の目的

本研究では、TC-NER の分子機構を解明するために、新規 TC-NER 因子の同定、Po1 II および CSA、CSB をはじめとする TC-NER 因子の機能とそれらの相互作用の役割、ユビキチン化ネットワークの意義を明らかにすることを研究目的とした。一方、XP、CS、TTD といった NER 機構に異常をもつ遺伝性疾患にみられる臨床症状の全てを NER の異常のみでは説明できない。NER 因子が DNA 修復以外の多様な機能を細胞内で発揮していることが考えられる。そこで、NER 因子がどのような新規機能を持ち、それが XP、CS、TTD の病態にどのように関与するのかを明らかにすることも本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) TC-NER 過程において、UV 照射後にユビキ

チン化される RPB1 のリジン残基を特定することを目的として、RPB1 をドメインごとに分割して試験管内転写翻訳系で調製し、CSA 複合体によるユビキチン化を調べた。ユビキチン化された断片内のリジン残基をアルギニン残基に置換した変異体を用いて CSA 複合体によるユビキチン化部位を特定した。さらに、ユビキチン化部位を置換した RPB1 発現細胞を作製し、UV 感受性、UV 照射後の RNA 合成の回復、TC-NER 関連因子との相互作用について調べた。(2)TC-NER 機構に異常をもつ紫外線高感受性症候群 A 群(UV^S-A)の原因遺伝子クローニングを目的として、UV^S-A 患者細胞に微小核融合法によりマウスの染色体をランダムに導入し、紫外線抵抗性を示すクローンを複数得た。それらのクローンが共通して持っているマウスの染色体領域を比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ解析により決定した。さらにこの領域をカバーする BAC を患者細胞に導入することによりマウス当該遺伝子を同定し、相同性からヒト遺伝子も同定し、UVSSA と命名した。UVSSA タンパク質と相互作用するタンパク質を解析するとともに、欠失変異体によりその相互作用する領域を決定した。また、これらの変異体発現細胞の UV 感受性、UV 照射後の RNA 合成の回復を調べた。UVSSA は脱ユビキチン化酵素である USP7 と複合体を形成することをみつけたので、UVSSA、USP7、UVSSA-USP7 複合体を精製し、それぞれの酵素活性について生化学的な解析を行った。(3)CSB の新規機能を明らかにする目的で、CSB の C 末端の種々の部位を欠失する変異体発現細胞を作製し、それらの UV 感受性、UV 照射後の RNA 合成の回復、TC-NER 関連因子との相互作用等について調べた。また、免疫沈降した CSB タンパク質で UV 照射後のユビキチン化と SUMO 化を検討した。(4)XPG や XPD の NER 以外の新規機能を明らかにすることを目的として、XPG、XPD が含まれる複合体の全体像の把握、それらの機能の解明、XP、CS、TTD 患者の病態との関係についての解析を行った。

4. 研究成果

(1)RPB1 のユビキチン化の機構と TC-NER における意義：

CSA 複合体が試験管内で RPB1 をユビキチン化する部位を特定し、このアミノ酸残基を置換した変異 RPB1 を発現する細胞を作製した。変異 RPB1 は Pol II 複合体を形成し、RNA 合成も正常であった。一方、UV 照射後の RPB1 のユビキチン化はこの変異体で低下しており、細胞内においてもこのリジン残基がユビキチン化されることが示された。変異 RPB1 発現細胞では UV 照射後の Pol II と CSA、CSB との相互作用は正常であったが、UV 高感受性となり、TC-NER の指標となる UV 照射後の RNA 合成の回復も低下していた。この結果は RPB1 のユビキチン化が TC-NER に関与することを示している(図 1)。

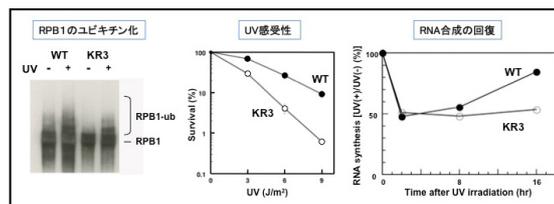


図 1 CSA 複合体による RPB1 のユビキチン化は TC-NER に必須である

(2)UVSSA 遺伝子のクローニングとその機能解析：

紫外線高感受性症候群(UV^S)のなかで原因遺伝子のわかっていなかった UV^S-A 群の原因遺伝子を同定し、UVSSA 遺伝子と命名した。紫外線に高感受性を示す UV^S-A 群患者由来の細胞にマウスの染色体をランダムに導入し、紫外線高感受性を相補する遺伝子をつきとめた。ヒトの遺伝子もマウス遺伝子との相同性から同定した。UVSSA 遺伝子には UV^S-A 群患者でフレームシフト変異がホモ接合性に認められ、原因遺伝子であることが確認された。遺伝子産物 UVSSA には、機能を予測できるアミノ酸配列は存在しなかったが、脱ユビキチン化酵素 USP7 と複合体を形成することがわかった。

また、UVSSA は CSA とは UV 照射に関係なく相互作用し、UV 照射後にはクロマチン画分で CSB、Po1 II と相互作用した。また、UVSSA は USP7 と協調して、CSB が UV 照射後にプロテアソームにより分解されるのを抑制することを明らかにした。この CSB の安定化が転写の回復に関与すると考えられた (図 2)。

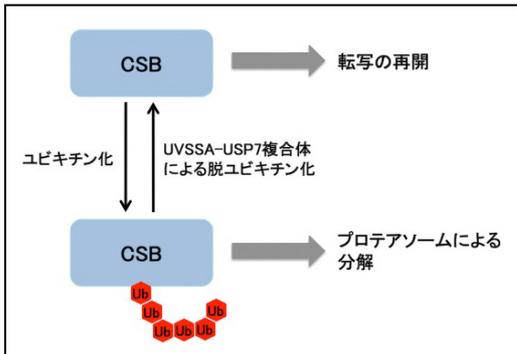


図 2 UVSSA 欠損は、CSB のポリユビキチン化、ひいては分解を促進する

ついで、USP7 との結合に必要な UVSSA 内の領域を決定した。さらに、この領域内のアミノ酸置換により USP7 と結合できなくなった変異 UVSSA はプロテアソームにより分解されたので、UVSSA は USP7 と結合することにより安定化されることが示された。一方、USP7 の脱ユビキチン化活性は UVSSA との結合により低下することがわかった。UVSSA がユビキチンリガーゼ活性をもち、自己モノユビキチン化する

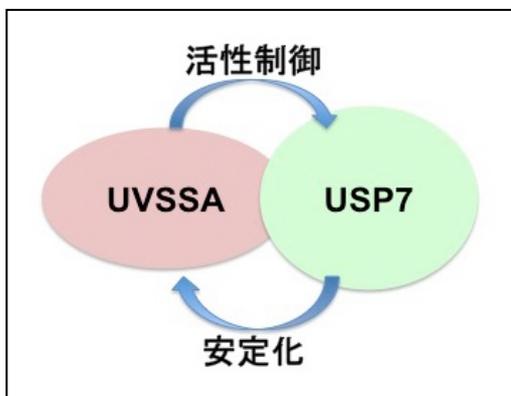


図 3 UVSSA は USP7 と結合することにより安定化され、USP7 の脱ユビキチン化活性は UVSSA との結合により低下する

ことがわかった (図 3)。さらに、モノユビキチン化部位を決定した。このアミノ酸を置換した UVSSA 発現細胞では UV 高感受性になったので、自己モノユビキチン化が UV 感受性に関与することが示唆された。

(3)CSBのC末端近傍領域の機能解析：

CSBの機能にはATPaseドメインとユビキチン結合ドメイン(UBD)が必須であるという報告があるが、さらにC末端近傍の領域も機能に必須であることを明らかにした。C末端欠失CSBはUV照射後にクロマチンやPo1 IIに結合できなくなり、この変異CSB発現細胞はUV高感受性でTC-NER能が低下していた。また、CSBがUV照射後SUMO化されることも明らかにした。SUMO化CSBはクロマチンに局在し、CSAやUVSSAが欠損した細胞でもCSBのSUMO化に変化はなかった。また、ATPaseが失活したCSBやUBDを欠失したCSBでもSUMO化はみられた。CSAとUVSSAのSUMO化は検出されなかった。さらに、CSBのN末端に近いアミノ酸の置換によりSUMO化が低下すること明らかにした。この変異CSB発現細胞(KR)ではUV高感受性となり、UV照射後のRNA合成が回復しないことから、CSBのSUMO化がTC-NERに関与することが示された(図4)。

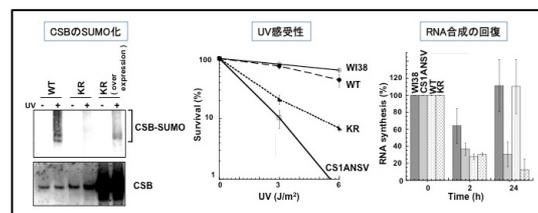


図 4 CSBのSUMO化がTC-NERに関与する

(4)TFIIH 非依存性の XPD-MMS19 複合体(MMXD)の同定とその機能：

基本転写因子 TFIIH は 10 個のサブユニットからなる蛋白質複合体であり、XPB、XPD、TTDA を含み、NER にも必須の因子である。我々は、XPD 蛋白質が、TFIIH とは独立して、MMS19 や MIP18 (新規蛋白質) 等と新規複合体を形成す

ることを明らかにし、MMXD (MMS19-MIP18-XPB) 複合体と命名した。そして、MMS19、MIP18、XPB が細胞分裂期で紡錘体と一部共局在すること、それらのノックダウン細胞は分裂期で紡錘体やクロマチンの局在異常を示し、分裂間期細胞で異常核を示すことを明らかにした。また、XP-D や XP-D/CS 患者細胞では、XPB のノックダウン細胞同様に、細胞分裂期の紡錘体やクロマチンの局在異常、分裂間期での異常核を高頻度に示すことを明らかにし、XP-D や XP-D/CS 患者の病態に MMXD の機能異常が関与していることを示唆した。

(5) EGF 刺激後の前初期遺伝子 *FOS* の発現誘導やハウスキーピング遺伝子発現における XPG の関与：

XPG が TFIIH とともに、転写伸長複合体と相互作用することを明らかにした。また、XPG-TFIIH 複合体は EGF 刺激後の *FOS* 遺伝子座やハウスキーピング遺伝子の *EEF1A1* 遺伝子座など、転写が行われている領域全体にリクルートされた。この現象は、正常 XPG や XP のみを引き起こす点変異 XPG では観察されたが、CS を併発するような C 末端欠損 XPG では観察されなかった。そして、XP-G 患者細胞や XP と CS を合併する XP-G/CS 患者細胞において、EGF 誘発 *FOS* 遺伝子発現の発現を調べた結果、XP-G/CS 細胞では XP-G 細胞よりも *FOS* 遺伝子発現が強く抑制された。CS 発症に転写異常が関与することが強く示唆された (図 5)。

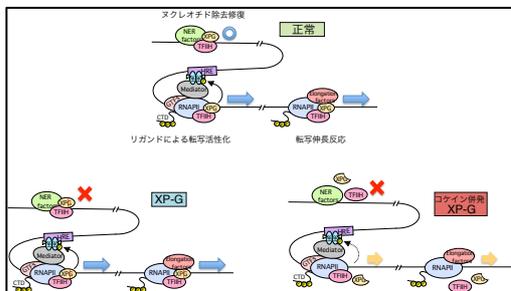


図 5 XPG は前初期遺伝子 *FOS* の発現に関与し、XP-G/CS 細胞ではその機構に異常をもつ

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

(1) Kiyoji Tanaka. Our research over the past 40 years on the mechanisms underlying and disorders associated with nucleotide excision repair. *Photomedicine and Photobiology*, 36, 11-18, 2014 査読なし、[URL:http://square.umin.ac.jp/jssp/member/proceed/proceedings.pdf](http://square.umin.ac.jp/jssp/member/proceed/proceedings.pdf)

(2) Xue Zhang, Katsuyoshi Horibata, Masafumi Saijo, Chie Ishigami, Akiko Ukai, Shin-ichiro Kanno, Hidetoshi Tahara, Edward G. Neilan, Masamitsu Honma, Takehiko Nohmi, Akira Yasui and Kiyoji Tanaka. Mutations in *KIAA1530/UVSSA* cause UV-sensitive syndrome destabilizing ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nature Genetics*, 44, 593-597, 2012. 査読あり、doi: 10.1038/ng.2228.

(3) Shinsuke Ito, Li Jing Tan, Daisuke Andoh, Takashi Narita, Mineaki Seki, Yasuhiro Hirano, Keiko Narita, Isao Kuraoka, Yasushi Hiraoka and Kiyoji Tanaka. MMXD, a TFIIH-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Molecular Cell*, 39, 632-640, 2010. 査読あり、doi: 10.1161/ATVBAHA.110.211755.

(4) Arato Takedachi, Masafumi Saijo and Kiyoji Tanaka. The DDB2 complex-mediated ubiquitylation around DNA damage is oppositely regulated by XPC and Ku, and contributes to the recruitment of XPA. *Molecular and Cellular Biology*, 30, 2708-2723, 2010. 査読あり、doi: 10.1128/MCB.01460-09.

[学会発表] (計 33 件)

(1) Kiyoji Tanaka. "Regulation of transcription elongation by XPG-TFIIH complex is implicated in Cockayne syndrome", 5th US-Japan DNA Repair Meeting, October

28-30, 2014, Grand XIV Naruto, (Naruto city, Tokushima prefecture)

(2) 田中 亀代次. 「ヌクレオチド除去修復研究の40年：過去から未来へ」 第36回 光医学・光生物学会、2014年7月25-26日、大阪大学銀杏会館、(吹田市、大阪府)

(3) Kiyoji Tanaka. “XPG, a nucleotide excision repair factor is required for transactivation and transcription elongation: Implication for the pathogenesis of XP-G/CS”,

International Symposium on “XP & Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response – Bench to Bedside”, March 5-7, 2014. Kobe International Conference Center, (Kobe city, Hyogo prefecture)

(4) Kiyoji Tanaka. “Non-canonical function of nucleotide excision repair factor: Implication for XP/CS”, Gordon Research Conference “Mammalian DNA Repair”, February 10-15, 2013, (Ventura city, California, USA)

(5) Kiyoji Tanaka. “Mechanism and disorders of transcription-coupled repair”, 3rd Erling Seeberg Symposium, June 19-24, 2012, (Trondheim city, Norway)

(6) Kiyoji Tanaka. “Mutations in *KIAA1530/UVSSA* cause UV-sensitive syndrome and destabilize CSB in transcription-coupled DNA repair”, The 4th US-Japan DNA Repair Meeting, April 11-14, 2012, The National Conference Center (Leesburg city, Virginia, USA)

(7) Kiyoji Tanaka. Early Bird Seminar: “Molecular mechanism and inherited disorders of nucleotide excision repair”, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日-16日 (横浜市、神奈川県)

(8) Kiyoji Tanaka. Keynote Lecture “Molecular Mechanism and Human Inherited Disease of Nucleotide Excision Repair”, Conference “Responses to DNA damage: from

molecular mechanism to human disease”, April 3-8, 2011 (Egmond aan Zee, The Netherlands)

(9) Kiyoji Tanaka. “XPD forms a TFIIH-independent protein complex involved in chromosome segregation” Workshop on xeroderma pigmentosum and other diseases of human premature aging and DNA repair: molecules to patients. September 21-24, 2010, The National Conference Center (Leesburg city, Virginia, USA)

[図書] (計1件)

(1) 田中亀代次、西條将文.

「プログレッシブ 生命科学」南山堂 米田悦啓、岡村康司、金井好克、西田幸二 編 ISBN 978-4-525-13431-0

第2章 DNAとゲノム、9~25頁を執筆
全体：312頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 亀代次 (TANAKA, Kiyoji)

大阪大学・生命機能研究科・特任教授

研究者番号：80144450

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし