

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02820

研究課題名(和文) 転写と共役したヌクレオチド除去修復の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of transcription-coupled nucleotide excision repair

研究代表者

西條 将文 (SAIJO, Masafumi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：90221986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000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)」の解析を行い、TC-NER因子の機能について以下の結果が得られた。(1) CSBのC末端領域とSUMO化がTC-NERにおいて重要である。(2) UVSSAはUSP7と解離するとプロテアソームにより分解されTC-NER欠損となるが、ユビキチン化部位に変異を導入すると分解は抑制されTC-NERも正常になる。(3) RNAポリメラーゼIIのユビキチン化は損傷除去後の転写のリスタートに関与する可能性がある。これらの結果はTC-NERの分子機構の解明につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER), a subpathway of nucleotide excision repair that rapidly removes transcription-blocking DNA damage, and the following results on the functions of TC-NER factors were obtained. (1) The C-terminal region and SUMOylation of CSB plays critical roles in TC-NER. (2) UVSSA is degraded by proteasome upon dissociation from USP7, resulting in TC - NER deficiency, but when a mutation is introduced at the ubiquitination site, degradation is suppressed and TC - NER becomes normal. (3) Ubiquitination of RNA polymerase II may be involved in the restart of transcription after removal of transcription-blocking DNA damage. These results are important cues to reveal molecular mechanism of TC-NER.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヌクレオチド除去修復 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 UV

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大きな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、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、言葉通りゲノム上のどの場所の DNA 損傷でも除去する。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 XPC 複合体、DDB2 複合体が損傷認識因子として働く。我々は、(1)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-CuI4A-Roc1 複合体を形成する、(2)DDB2 複合体が損傷 DNA に結合し、XPC 複合体をリクルートする、(3)DDB2 複合体によるユビキチン化により、DDB2 複合体の損傷部位からの解離、XPC 複合体の損傷への強固な結合、ヒストンのユビキチン化、NER 共通因子のリクルートが引き起こされる、ことを示した。これらの結果より、タンパク質間の相互作用により個々の因子の機能が統合されて損傷が認識され修復反応が進行すること、ユビキチン化がその過程で重要な役割を果たすことが明らかになった。

ヒトの TC-NER では、転写伸長中の RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が損傷部位で停止することが引き金になり、TC-NER 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ている。TC-NER 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)や紫外線高感受性症候群(UVSS)の原因遺伝子産物 CSA, CSB, UVSSA が明らかになっているが、TC-NER の分子機構はまだ明らかではない。DNA 損傷の有無による TC-NER 因子間の相互作用の変化についてはかなり解ってきたが、個々の因子の機能について不明な部分が多く、cell-free 系も確立していないため、損傷の認識から除去に至る反応の具体的な全体像が描けていない。

我々は、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こと示す以下の知見を得ていた。

- UV 照射した細胞では、Pol II の最大サブユニット(RPB1)のポリユビキチン化が照射直後から観察される。このユビキチン化は CSA と CSB に依存的である。
- UV 照射した細胞のクロマチン画分で、Pol II と CSA が CSB 依存的に相互作用する。
- CSA が前述の DDB2 と同様に CSA-DDB1-CuI4A-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。
- CSA 複合体による RPB1 のユビキチン化部位を特定し、この部位でユビキチン化が起こらない変異 RPB1 発現細胞では TC-NER が低下する。
- UVSSA 欠損細胞に UV を照射すると CSB のプロテアソームによる分解が亢進する。
- UVSSA は脱ユビキチン化酵素 USP7 と複合体を形成する。
- UVSSA は UV 未照射時に CSA と、UV 照射時に CSA に加えて Pol II, CSB との相互作用が検出できる。

以上の結果より、我々は TC-NER の初期過程として以下のモデルを考えている。

DNA 損傷により Pol II の転写伸長がブロックされると、クロマチンリモデリング活性を持つ CSB が働き、Pol II や周辺のヌクレオソームの結合状態あるいは DNA や新生 RNA との相互作用を変化させ、CSA 複合体が損傷部位に結合する。RPB1, CSB がポリユビキチン化された後、NER 共通因子がリクルートされ修復反応が進行する。CSA 複合体と同時に UVSSA-USP7 複合体もリクルートされてきて、ユビキチン鎖長を制御することにより、修復開始のシグナルと不要になった TC-NER 因子の分解の 2 つの機能を担っている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

TC-NER は、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機構である。転写伸長中の Pol II が損傷部位で停止することが引き金となり修復反応が始まると考えられているが、分子機構は明らかではない。これまでの結果より、TC-NER の損傷の認識などの初期過程において、関与する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ことが示された。本研究では、Pol II および TC-NER 因子の機能と相互作用の役割、ユビキチン化ネットワークの意義を明らかにすることにより、TC-NER の分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CSB の機能を明らかにするために、CSB 変異体を発現する細胞を作製し、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等について調べた。また、免疫沈降した CSB で UV 照射後のユビキチン化と SUMO 化を検討した。SUMO 化の TC-NER への関与を明らかにするために、SUMO 化 E2 である Ubc9 を siRNA によりノックダウンし、CSB の SUMO 化と UV 照射後の RNA 合成の回復を調べた。

(2) UVSSA の欠失変異体を発現する細胞を作製し、免疫沈降により CSA と USP7 との結合領域を決定した。また、それらの細胞の UV 感受性、UV 照射後の RNA 合成の回復を調べた。UVSSA を含むタンパク質複合体をアフィニティ精製した後にゲルろ過を行い、各分画に含まれるタンパク質を調べることにより複合体の構成成分を解析した。UVSSA は大腸菌で発現させると大部分が不溶性になり精製タンパク質の調製が困難であったが、バキュロウイルス発現系により UVSSA、USP7 ならびに UVSSA-USP7 複合体の精製法を確立し、性状を調べた。また、UVSSA 欠失変異体も精製し、結合実験や試験管内ユビキチン化反応を行った。1 アミノ酸置換体を作製し、USP7 との結合やユビキチン化に必要なアミノ酸残基を同定し、それらの変異の影響を調べた。

(3) CSA 複合体をアフィニティ精製とゲルろ過により調整した。ユビキチンリガーゼ活性の重合特異性を変異ユビキチンを用いた試験管内反応で解析した。コケイン症候群患者由来のミスセンス変異あるいは C 末端欠失変異をもつ CSA を発現させ、複合体の形成、UV 感受性、UV 照射後の RNA 合成の回復について調べた。

(4) 試験管内ユビキチン化反応により同定した Pol II 最大サブユニット RPB1 のユビキチン化部位を置換した変異体を発現する細胞を作製し、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。また、この細胞に UV 照射した後の遺伝子上のシクロブタン型ピリミジンダイマー量を転写鎖型鎖と非転写鎖に分別して定量し、野生型 RPB1 発現細胞と比較した。

(5) 色素性乾皮症患者由来あるいは色素性乾皮症とコケイン症候群を合併する患者由来の変異をもつ XPG を発現する細胞を作製し、XPG の転写における機能をリアルタイム PCR と ChIP で解析した。

4. 研究成果

(1) CSB の C 末端近くに存在するユビキチン結合ドメインならびに最も C 末端にある 30 アミノ酸残基をそれぞれ欠失させると細胞は UV 高感受性になり、UV 照射後の RNA 合成の回復も見られなかった。これらの領域が TC-NER に必須であることが明らかになった。また、これらの変異体は RNA ポリメラーゼ II との結合が低下することもわかった。

CSB が UV 照射後に SUMO 化修飾を受けることを見いだした。CSA と UVSSA では SUMO 化は検出されなかった。また、CSB の SUMO 化は CSA と UVSSA には依存しなかった。SUMO 化されない CSB の 1 アミノ酸置換 (K205R) を同定して、その変異体を発現する細胞を作製した。CSB K205R 変異体を発現する細胞および SUMO 化 E2 である Ubc9 をノックダウンした細胞では CSB が SUMO 化されず、UV 照射後の RNA 合成の回復も見られなくなることから、CSB の SUMO 化が TC-NER において重要な役割を担うことを明らかにした (図 1)。

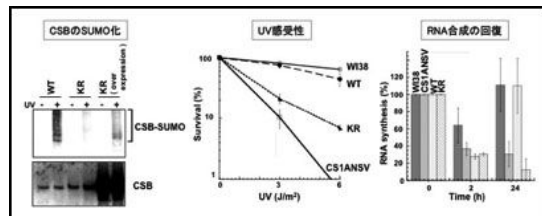


図 1 CSB K205R は UV 照射後の SUMO 化が起こらず、その発現細胞は TC-NER を欠損していた。

CSB は UV 照射後 Pol II や CSA と強く結合するが、SUMO 化部位変異 CSB では、それらの相互作用が低下していることがわかった。また、この変異体発現細胞および Ubc9 ノックダウン細胞では、Pol II の UV 照射後のユビキチン化が低下していた。CSB の SUMO 化が TC-NER 因子との相互作用ならびに Pol II のユビキチン化に関与すると考えられた。

(2) UVSSA の欠失変異体の免疫沈降により、UVSSA は N 末端の VHS ドメインと中央の領域で CSA と USP7 とそれぞれ結合することがわかった。これらの領域を欠失すると細胞は UV 高感受性になり UV 照射後の RNA 合成の回復が見られなくなることから、UVSSA と CSA、USP7 の結合が TC-NER に重要であることが明らかになった。

CSA や USP7 との結合領域ではない UVSSA の C 末端側には機能未知ドメイン DUF2043 が存在し、このドメインを含む C 末端を欠失させると UV 高感受性となった。更に、DUF2043 を残してそれ以降の C 末端を欠失させても UV 高感受性となった。これらの結果より、DUF2043 と C 末端領域が TC-NER に重要である

ことが明らかになった。また、UVSSA は USP7、CSA と結合するが、USP7 と複合体を形成したまま CSA と結合できることがわかった。

UVSSA の USP7 結合領域内の 1 アミノ酸を置換し、USP7 と結合できない変異体(S254A)を作製した。この変異 UVSSA は細胞内でプロテアソームによる分解を受けやすくなり、TC-NER 欠損となる(図 2)。USP7 の脱ユビキチン活性により UVSSA が分解から保護されて TC-NER で機能することが示唆された。

精製した UVSSA 欠失変異体でユビキチン化の有無を調べてユビキチン化される領域を特定し、1 アミノ酸置換体によりユビキチン化されるリジン残基(K414)を同定した。ユビキチン化されない変異体(K414R)の解析により、このリジン残基でのユビキチン化が UVSSA の分解に関与することが明らかになった。UVSSA S254A-K414R 二重変異体は、USP7 とは結合できないがプロテアソームによる分解を受けなかった。この二重変異体を発現する細胞は、UVSSA K414R 発現細胞と同様に TC-NER は正常であった(図 2)が、UV に若干高感受性を示した。UVSSA が分解されないことにより TC-NER 以外の点で影響がでたと考えられる。

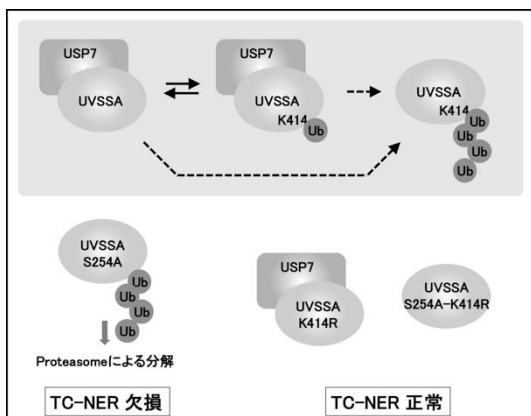


図 2 UVSSA のユビキチン化標的的部位として K414 を同定した。UVSSA-S254A は、USP7 との相互作用が不十分であり、K414 でユビキチン化されプロテアソームによって急速に分解され、TC-NER の欠損につながる。K414R の置換は、UVSSA の分解を阻害し、それによって TC-NER の欠損を抑制した。

(3) CSA 複合体(CSA-DDB1-CuI4A-Roc1)はユビキチンリガーゼ活性を持つ。変異ユビキチンを用いて重合特異性を調べたところユビキチンの 48 番目のリジン残基以外でも重合可能であることがわかった。CSA 複合体によるユビキチン化がタンパク質の分解以外に関与する可能性が示された。

CSA は 7 つの WD リピートによりプロペラ構造を形成する。コケイン症候群患者由来のミスセンス変異で分子構造に影響を与えない

と推測される CSA 変異体 7 種類を CSA 欠損細胞で発現させて調べたところ、いずれも DDB1 との結合がみられないか低下しており、複合体の形成不全が TC-NER 欠損の原因と考えられた。

CSA のプロペラ構造に関与しない C 末端を欠失させた変異体を発現する細胞は UV 高感受性になり、UV 照射後の RNA 合成の回復も見られなかったことから、CSA の C 末端領域が TC-NER に重要であることが明らかになった。これらの変異体は DDB1 と結合しユビキチンリガーゼ複合体を形成することができたので、C 末端領域は基質タンパク質や TC-NER 因子との結合に寄与すると考えられた。

(4) UV 照射後のユビキチン化が低下する Pol II 変異体を発現する細胞では、UV による RNA 合成の低下は回復しなかったが、転写鎖型鎖・非転写鎖それぞれの損傷の除去は正常細胞とほとんど差がみられなかった。また、NER 因子との相互作用にも変化がなかった。この細胞では損傷除去後の転写のリスタートに異常があり、その過程で RPB 1 のユビキチン化が重要な役割を担っていることが示唆された。

(5) XPG が TFIIH と相互作用して転写伸長に関与し、XPG 遺伝子の変異によるコケイン症候群の患者由来細胞では XPG-TFIIH が転写伸長部位に集まらないことを明らかにした。これらの結果より、転写伸長の異常がコケイン症候群患者の病態の一部を説明できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

M. Higa, K. Tanaka, M. Saijo
Inhibition of UVSSA ubiquitination suppresses transcription-coupled nucleotide excision repair deficiency caused by dissociation from USP7. *FEBS Journal* 査読有 285 (2018) 965-976
doi: 10.1111/febs.14382

M. Higa, X. Zhang, K. Tanaka, M. Saijo
Stabilization of ultraviolet (UV)-stimulated scaffold protein A by interaction with ubiquitin-specific peptidase 7 is essential for transcription-coupled nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 査読有 291 (2016) 13771-13779
doi: 10.1074/jbc.M116.724658

Y. Sin, K. Tanaka, M. Saijo
The C-terminal region and SUMOylation of Cockayne syndrome group B protein play critical roles in transcription-coupled nucleotide

excision repair.

J. Biol. Chem. 査読有 291 (2016) 1387-1397
doi: 10.1074/jbc.M115.683235

T. Narita, K. Narita, A. Takedachi, M. Saijo,
K. Tanaka

Regulation of transcription elongation by the
XPG-TFIIH complex is implicated in Cockayne
syndrome.

Mol. Cell. Biol. 査読有 35 (2015) 3178-3188
doi: 10.1128/MCB.01401-14

〔学会発表〕(計 6件)

西條将文

転写を阻害する DNA 損傷を除去する仕組み：
転写と共役したヌクレオチド除去修復に関
与する因子の機能解析
第6回バイオシグナル研究会 2018年
神戸大学六甲ホール

比嘉光、田中亀代次、西條将文

UVSSA コピキチン化の阻害は USP7 からの解離
で引き起こされた転写と共役したヌクレオ
チド除去修復の欠損を抑制する
第40回日本分子生物学会年会 2017年
神戸国際展示場

比嘉光、Zhang Xue、田中亀代次、西條将
文

USP7との結合によるUVSSAの安定性は転写と
共役したヌクレオチド除去修復において必
須である

第39回日本分子生物学会年会 2016年
パシフィコ横浜

申 育實、田中亀代次、西條将文

転写と共役した修復における CSB タンパク質
の機能には C 末端領域と SUMO 化が必要であ
る

第38回日本分子生物学会年会 2015年
神戸国際展示場

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/
12/](http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/12/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

西條 将文 (SAIJO, Masafumi)
大阪大学・生命機能研究科・准教授
研究者番号：90221986

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし