

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 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：15K08177

研究課題名(和文) 神経分化における伸長因子Elongin Aの標的遺伝子の探索とその制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of target genes of transcription elongation factor Elongin A and analysis of its regulation

研究代表者

安川 孝史 (Yasukawa, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：60291936

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)：ChIPシーケンス解析により神経分化に関わるnon-coding RNA遺伝子(Miat)やホメオボックス遺伝子(Hox)等の一群の遺伝子が標的遺伝子である可能性が示唆された。また、(1)UV照射などのDNA傷害型刺激だけでなく、RNAポリメラーゼII伸長阻害剤やレチノイン酸処理等のDNA非傷害型刺激によってもElongin AユビキチンリガーゼE3(EloA-E3)複合体の形成が誘導される、(2)これらの刺激によって、同複合体とコケイン症候群Bタンパク(CSB)の結合が誘導される、(3)CSBがDNA傷害部位へのEloA-E3複合体を安定にリクルートするのに必要である、こと等が判明した。

研究成果の概要(英文)：The possibility that homeobox (Hox) genes and non-coding RNA (Miat) gene were the target genes of Elongin A (EloA) was suggested by ChIP-Seq analysis using anti-RNA polymerase II (Pol II) and anti-EloA antibodies. These genes play an important role of the neural development. Moreover, we demonstrated (i) that assembly of the EloA ubiquitin ligase (EloA-E3) is triggered following DNA damage as well as by treatment of cells with drugs that block Pol II elongation (ii) that the assembly is also triggered by induction of ER and nutrient stress and by retinoic acid treatment (iii) that EloA-E3 associate in cells with the Cockayne syndrome B (CSB) protein and (iv) that this interaction is also induced by DNA-damaging agents and alpha-amanitin (v) 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 A 転写伸長因子 神経分化 ユビキチンリガーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の転写は、開始、伸長、終結の3つのステップから成る。最近のゲノムワイドな遺伝子発現解析の結果、多くの遺伝子ではRNAポリメラーゼII (Pol II) が開始直後に停止して発現待機状態にあることが分かってきた。これを解除して伸長を再開するには、伸長因子という一群の転写因子の作用が必須である。同因子は、これまでに20個程単離され、その内のいくつかはヒトの疾患病態(急性白血病、Cockayne 症候群等)と密接に関連することが知られている(Thirman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994, Varon et al. *Nat. Genet.* 2003)。これら伸長因子の一つであるElonginは、伸長促進活性を有するAサブユニット、その活性を正に制御するBならびにCサブユニットの三量体から成る(Aso et al. *Science*, 1995)。ショウジョウバエのホモログであるdElongin Aがハエの適切な発生に必須であることが知られている(Gerber et al. *Mol. Cell. Biol.* 2004)が生体内での働きは不明であった。

我々は、これまでにElongin Aホモ欠失( $EloA^{-/-}$ )マウスが胎生致死となり、同胎仔由来の線維芽細胞が早期老化等のストレス耐性低下を示すこと(Miyata, Yasukawa et al. *Cell Death Differ.*, Yasukawa et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007)やElongin AがUV等のDNA傷害刺激によりユビキチンリガーゼ(E3)として機能し、Pol IIの分解にも関与するユニークな転写伸長因子であること(Yasukawa et al. *EMBO J.* 2008)を明らかにしてきた。最近、

- (1)  $EloA^{-/-}$  ES細胞ではレチノイン酸による神経への分化能が顕著に低下していること、
- (2)  $EloA^{-/-}$  マウス胎仔では脳・脊髄における感覚神経系の形成が著しく損なわれているこ

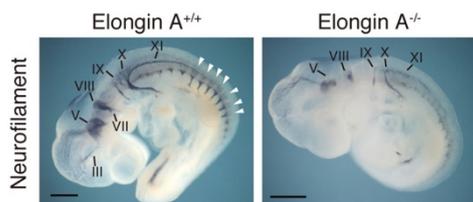


図1: Elongin Aホモ欠失マウス胚では神経系の形成が顕著に損なわれている。(胎生10.5日胚を抗ニューロフィラメント抗体で染色) III: 動眼神経、V: 三叉神経、VII: 顔面神経、VIII: 内耳神経、IX: 舌咽神経、X: 迷走神経、XII: 舌下神経、矢印: 脊髄神経節

と(図1)、(3) それらの異常は神経堤細胞から感覚神経への分化に必要な *Sox10*、*Neurogenin1* (Ma et al. *Neuron* 1998, Fode et al. *Neuron* 1998, Ma et al. *Genes Dev.* 1999)等の転写制御因子の発現がElongin Aの欠損により低下することが原因であること(図2)、を明らかにした(Yasukawa et al. *Cell Rep.* 2012)。

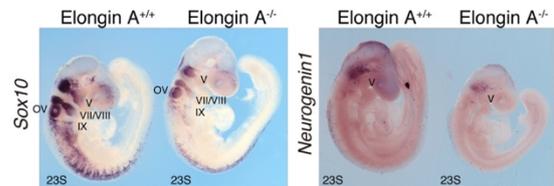


図2: Elongin Aホモ欠失マウス胚では、感覚神経系の形成に必要な遺伝子の発現が低下している。(胎生10.5日胚の *in situ* ホールマウントハイブリダーション)

しかし、神経分化におけるElongin Aの標的遺伝子の全容やその制御機構などまだ不明な点が多く残っている。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経分化におけるElongin Aの標的遺伝子の網羅的探索とその制御機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ChIP-シーケンス (ChIP-Seq)

ES細胞を神経細胞へ分化させる方法として、浮遊培養により初期胚に似た構造を持つ胚様体を形成させる方法を用いる。野生型および  $EloA^{-/-}$  マウス ES細胞を用いてレチノイン酸 (RA) 非存在下で4日間、存在下で4日間浮遊培養して形成させた胚様体(培養開始後0, 4, 6, 8日目に回収)を、ホルムアルデヒドによりゲノムDNAとタンパク質をクロスリンクさせ断片化後、抗  $EloA$  抗体ならびに抗 Pol II 抗体を用いて  $EloA$ /Pol II/DNA を免疫沈降させる。脱クロスリンク後、DNA を精製、ライブラリーを作製して高速シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) により塩基配列を決定する。RA 添加により  $EloA$ /Pol II 間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する。

### (2) アクセプター退色法による FRET (AP-

FRET)の画像検出

Halo-Elongin A, mCherry-Cul5, GFP-CSB、Elongin B/C を HeLa、U2OS 細胞または、CSB 欠損細胞(CS1ANsv)、テトラサイクリン誘導型 CSB 発現細胞 (CS1ANsv-CSB: Tet-on) に transfection し、HaloTag R110Direct を培地に添加して、Halo-tag を rhodamin 110 で標識した。

R110Direct の蛍光は、488 nm レーザーで励起 500-550 nm 吸収フィルターで検出、mCherry の蛍光は 561 nm レーザーで励起、415-475 nm、580-650 nm マルチバンド吸収フィルターを用いて検出した。

#### 4. 研究成果

Elongin A の標的遺伝子を同定するために、抗 Elongin A 抗体を用いた ChIP-Seq を行ったところ、神経分化に関わるホメオボックス遺伝子 (*Hox*) 等の一群の遺伝子 ならびに *Miat*、*RMST* などの non-coding RNA 遺伝子上にレチノイン酸(RA) 依存的な Elongin A の集積が認められた(図 3)。さらに、複数の核内低分子 RNA (snRNA) 遺伝子、核小体低分子 RNA (snoRNA) 遺伝子、histone 関連遺伝子上にも Elongin A が顕著に集積していることが判明したため、野生型と Elongin A<sup>-/-</sup>型胚様体 を用いて、RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends)による qRT-PCR に

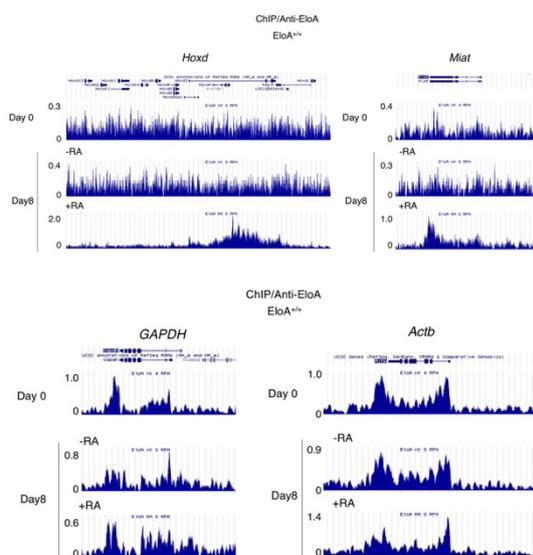


図3 抗 EloA 抗体による ChIP シークエンス  
EloA は RA 依存的に *Hoxd* 遺伝子、*Miat* 遺伝子上に集積する

より snRNA、snoRNA 遺伝子ならびに histone 関連遺伝子の転写状態(発現、転写産物のプロセッシング等)について解析を行ったが、両者の間で有意な差は認められず、これら遺伝子上では Elongin A は伸長や 3' プロセッシング以外の制御に関与している可能性が示唆された。

次に、抗 Elongin A 抗体を用いた ChIP-Seq 解析により、Elongin A の局在が認められた遺伝子上に Pol II が共局在することを確認するために、抗 Pol II 抗体 (D8L4Y)を用いて ChIP-Seq 解析を行った。その結果、野生型 ES 細胞(EloA<sup>+/+</sup>)では、RA による神経分化誘導刺激後、*Hox* 遺伝子ならびに *Miat* 遺伝子上に EloA と同様の Pol II の 集積パターンが認められた(図 4、EloA<sup>+/+</sup>)。

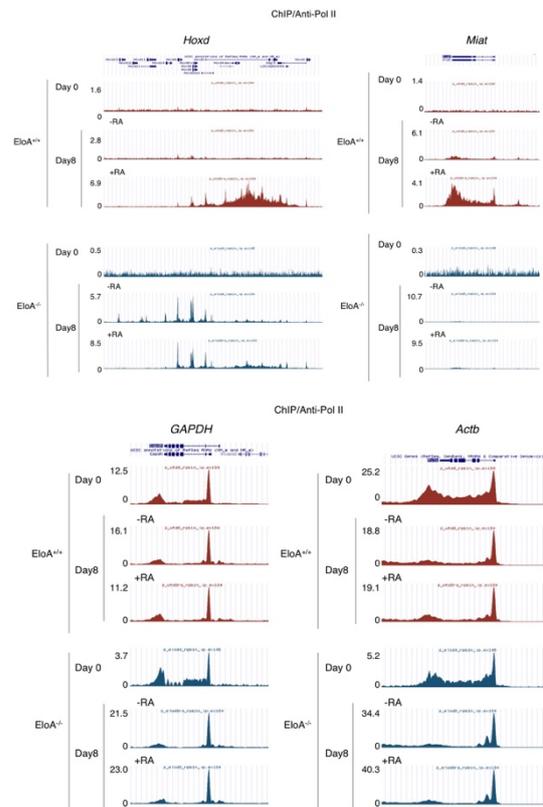


図4 抗 Pol II 抗体による ChIP シークエンス  
EloA<sup>+/+</sup>細胞では、RA 依存的に *Hoxd* 遺伝子、*Miat* 遺伝子上に Pol II が集積し EloA の集積と同様のパターンを示す

一方、EloA ホモ欠失型 ES 細胞(EloA<sup>-/-</sup>)では、転写開始点付近に Pol II の集積が認められたが、それ以降の遺伝子上では、野生型に比べて顕著に Pol II の集積が低下していることが判明した(図 4、EloA<sup>-/-</sup>)。

これらのことから、Elongin A が標的遺伝子の転写開始点上にリクルートされた Pol II

のリリースに参与している可能性が示唆された。また、Elongin A の生細胞内における動態を解析するために、蛍光タンパク質 (Halo-tag, mCherry-tag) を融合させた Elongin A (Halo-EloA)、Cullin 5 (mCherry-Cul5) を発現させた細胞を用いて、蛍光エネルギー共鳴移動 (FRET) を利用したライブイメージング解析を行ったところ、UV 照射だけではなく、DNA 非傷害型刺激である  $\alpha$ -アマニチン (Pol II 伸長阻害剤) 処理によっても Elongin A ユビキチンリガーゼ E3 (EloA-E3) 複合体形成が誘導されることが判明した。さらに、DNA 損傷チェックポイント経路の阻害剤である ATM キナーゼ阻害剤 KU60019 により、UV 照射後の同複合体形成が選択的に抑制されることが明らかとなった (図 5)。

これは、DNA 傷害型と非傷害型の刺激間で、

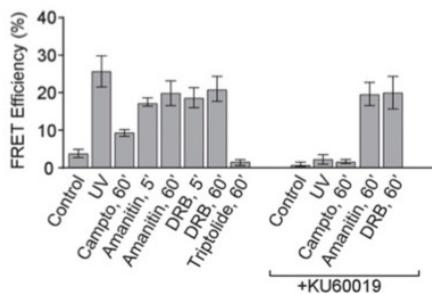


図 5 UV による DNA 傷害型刺激だけでなく  $\alpha$ -amanitin, DRB 等の非 DNA 傷害型刺激によっても Elongin A-E3 複合体の形成が誘導される

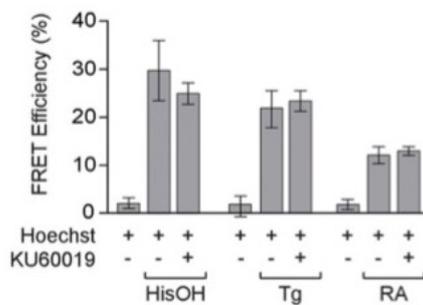


図 6 Elongin A-E3 複合体の形成は、ER ストレス誘導剤、栄養飢餓誘導剤、レチノイン酸刺激によっても誘導される (HisOH: histidinol, Tg: thapsigargin, RA: レチノイン酸)

EloA-E3 複合体の形成を誘導するメカニズムが異なることを示唆するものである。加えて、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 刺激によっても EloA-E3 複合体の形成が誘導されることも判明し (図 6) (Weems, Yasukawa et al. *J. Biol. Chem.* 2015)、同複合体が Pol II のユビキチン化/分解とは別に転写の促進にも働いている可能性が示唆された。

最近、Elongin A が神経分化に関わる遺伝子の発現に重要な働きをしていることが知られているコケイン症候群 B タンパク質 (CSB) と相互作用することが報告された。そこで、FRET を用いたライブイメージングにより、生細胞内における EloA-E3 複合体と CSB との相互作用について解析を行った。その結果、1) UV 照射などの DNA 傷害型刺激ならびに  $\alpha$ -アマニチン処理などの DNA 非傷害型刺激によって、同複合体と CSB の結合が誘導される (図 7)、2) CSB が DNA 傷害部位への EloA-E3 複合体を安定にリクルートするのに必要である (図 8)、

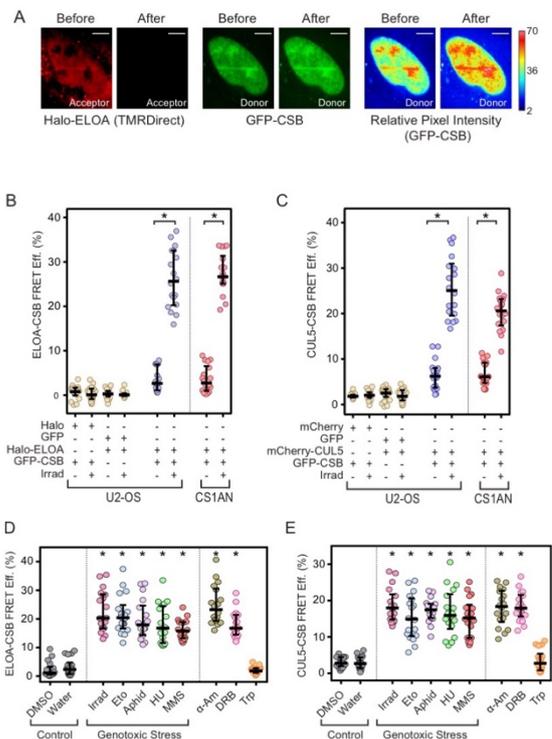


図 7 UV による DNA 傷害型刺激により CSB と EloA(A,B) ならびに Cul5(C) の会合が誘導される。これらの会合は、 $\alpha$ -amanitin や DRB による非 DNA 傷害型刺激によっても誘導される (D,E)

こと等が判明し (Weems, Yasukawa et al. *J. Biol. Chem.* 2017)、EloA と CSB が神経分化関連遺

伝子の転写制御に関わっている可能性が示唆された。

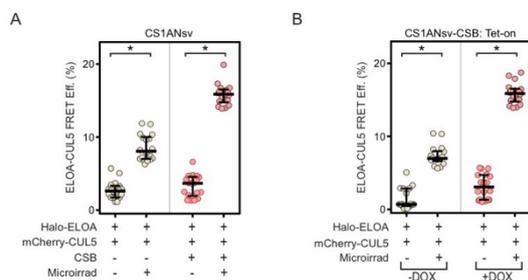


図 8 EloA と Cul5 は CSB 依存的に会合する  
 A: CSB 欠損細胞、B: テトラサイクリン誘導型 CSB 発現細胞を用いた

## 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)

①Juston C. Weems, Brian D. Slaughter, Jay R. Unruh, Stefan Boeing, Shawn M. Hall, Merry B. Mc Laird, Takashi Yasukawa, Teijiro Aso, Jesper Q. Svejstrup, Joan W. Conaway and Ronald C. Conaway, Cockayne syndrome B protein regulates recruitment of the Elongin A ubiquitin ligase to sites of DNA damage, *J. Biol. Chem.* 2017, 292:6431-6437, 査読有  
 DOI: 10.1074/jbc.C117.777946

②Juston C. Weems, Brian D. Slaughter, Jay R. Unruh, Shawn M. Hall, Merry B. Mc Laird, Joshua M. Gilmore, Michael P. Washburn, Laurence Florens, Takashi Yasukawa, Teijiro Aso, Joan W. Conaway, and Ronald C. Conaway, Assembly of the Elongin A Ubiquitin Ligase Is Regulated by Genotoxic and Other Stresses, *J. Biol. Chem.* 2015, 290:15030-15041, 査読有  
 DOI 10.1074/jbc.M114.632794

[学会発表] (計 1 件)

安川 孝史 , 筒井 文 , 佐藤 チェリ , 佐藤 滋生 , Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway , 麻生 倣二郎、 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. 11. 30-2016. 12. 02 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安川 孝史 (YASUKAWA, Takashi)  
 高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教  
 研究者番号 : 60291936

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

筒井 文 (TSUTSUI, Aya)