

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11639

研究課題名(和文) DNA損傷応答蛋白質の網羅的インタラクトーム解析

研究課題名(英文) Interactome analysis after induction of DNA damage in human cells

研究代表者

黒谷 賢一 (Kurotani, Kenichi)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・特任講師

研究者番号：10402778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答(DDR)はゲノムの安定化に極めて重要な反応である。DDR蛋白質の細胞内での機能を理解するためには、蛋白質-蛋白質間の相互作用ネットワークを詳細に知る必要がある。本研究では、精密質量分析装置を利用した、ヒト細胞におけるDDR蛋白質のインタラクトーム解析を実施する。本研究成果の一つとして、DNA損傷後に、RNAポリメラーゼIIの最大サブユニットであるPOLR2A/RPB1と相互作用する因子を複数個同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷応答(DDR)はゲノムの安定化維持機構に極めて重要な役割を持っている。事実、DDR機構の破綻は、成長発達障害、高発がん性、神経変性、早期老化などの様々な疾患の発症に関係していることが知られている。本研究で実施した、DNA損傷誘導後の精密質量分析装置を利用したインタラクトーム解析は、未解明のDDR分子機序の一端を解明したという点において、学術的に優れた成果であったと言える。

研究成果の概要(英文)：DNA damage response (DDR) is a crucial response for genome stability. A detailed understanding of their protein-protein interaction networks enables us to know the cellular function of DDR proteins. In this project, we performed the interactome analysis of DDR proteins in human cells using a high resolution mass spectrometry. In the results of our study, we identified several factors that interact with POLR2A/RPB1, the largest subunit of RNA polymerase II, after induction of DNA damage in human cells.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：DNA損傷応答 インタラクトーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は絶えず、内的要因 (生体内で生じる活性酸素種、DNA 複製中に生じるポリメラーゼのエラー) と外的要因 (紫外線、電離放射線、化学物質) に曝されつつも、ゲノムの安定性を維持している。DNA に損傷が生じた際に、これらの傷にตอบสนองする蛋白質 (DNA damage response, DDR) が正常に機能しない場合は、細胞レベルにおいては、細胞死、突然変異、染色体異常が誘導され、個体レベルにおいては、がんを含む様々な疾患が発症することが明らかになっている。このことから、DDR 蛋白質が正常に機能するための分子メカニズムを詳細に理解することは極めて重要である。

現在までに、DDR に関与する蛋白質は 450 個以上が報告されている (Pearl et al., Nat Rev Cancer 2015)。これら DDR 蛋白質は細胞内では単独で機能しているわけではなく、他の DDR 蛋白質と相互作用 (Protein-protein interaction) することで、機能的な蛋白質として働くことが可能となる。そして、異なった種類の DNA 損傷に対して、的確な DNA 修復経路の選択を行い、また、細胞周期チェックポイントの ON/OFF を制御することで、ゲノムの安定化に寄与している。

現在までの数多くの DDR 蛋白質に関する研究結果により、DDR 蛋白質の PPI ネットワーク、相互作用に重要なアミノ酸配列情報、ユビキチン化、リン酸化、SUMO 化、アセチル化、メチル化などの翻訳後修飾特異的に結合するために必要なドメイン構造などが明らかになってきた。しかしながら、依然として未解析の PPI が多数残されており、DDR 蛋白質ネットワークの全体像の理解へ向けての情報としては不十分であり、さらなる詳細な解析が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DDR 蛋白質について、精密質量分析装置を用いたインタラクトーム解析を実施することで、DDR 蛋白質ネットワークを構築し、DNA 損傷後に活性化されるシグナル伝達経路を明らかにすること、さらに、PPI ネットワークの破綻により発症する疾患の原因究明を行うことである。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術を用いた DDR 遺伝子内在性タグ付加細胞の作製とインタラクトーム解析: DDR 蛋白質に対するインタラクトーム解析を生理的条件下で実施するため、ゲノム編集技術を用いて、標的遺伝子の C 末端領域にタグ遺伝子配列と薬剤選択遺伝子配列を導入した (Natume et al., Cell Rep 2016)。人工遺伝子合成により、標的遺伝子のタグ挿入部位から両側 175 bp 程度の相同配列を合成し、それらを組み込んだコンストラクトを作製した。ゲノム編集効率を確認するための mClover 配列、Strep-Tactin を用いてプルダウンを実施するための Strep 配列、mClover 配列と Strep 配列が内在性標的遺伝子に導入された細胞を薬剤選択するための薬剤耐性遺伝子配列を発現するコンストラクトを作製した。上記発現コンストラクトと Cas9 と gRNA の発現コンストラクトを細胞にトランスフェクションし、48 時間後に薬剤選択を開始した。1 週間後、薬剤耐性細胞の中で mClover の発現を確認した。

薬剤耐性細胞 (15 cm ディッシュ 2 枚) から蛋白質を抽出し、Strep-Tactin セファロースを用いてプルダウンを行い、タグ付き標的蛋白質と相互作用する蛋白質を回収した。トリプシン分解・ペプチド精製後に、精密質量分析装置 (Q Exactive, Thermo Scientific) を用いてマスペクトルと保持時間のデータを取得した。生データは MaxQuant ソフトウェアを用いて、蛋白質同定を行った。

DNA 損傷後の POLR2A/RPB1 インタラクトーム解析: DNA 損傷後に、野生型もしくはゲノム編集法により作製した *ERCC61/CSB* 欠損 HeLa 細胞 (15 cm ディッシュ 2 枚) から DNA・RNA 分解酵素である benzonase 処理と高塩濃度のバッファーを処理し、蛋白質抽出を行い、POLR2A/RPB1 の CTD リピート Ser2 のリン酸化特異的抗体を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降物は FASP 法により、プロテオーム解析用のサンプルを作製し、課題 1 と同様の方法でインタラクトーム解析を実施した (Wisniewski et al., Nat Methods 2009)。

4. 研究成果

課題 1: CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた DDR 遺伝子内在性タグ付加細胞の作製とインタラクトーム解析

CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、標的遺伝子に内在性タグ付加を実施し、薬剤耐性細胞を蛍光顕微鏡下で確認した際に、mClover シグナルを確認することができた。しかしながら、薬剤耐性細胞であるにもかかわらず、mClover のシグナルを検出することができなかった遺伝子があった。これは、標的遺伝子の細胞内発現コピー数が、蛍光顕微鏡下で観察することができる検出限界以下であったこと、もしくは、標的遺伝子の C 末端領域にタグを付加したことにより、蛋白質の安定性が著しく低下したことが予想される。mClover シグナルを蛍光顕微鏡下で確認できた遺伝子については、インタラクトーム解析を実施した。本研究課題により、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた、ハイスループット PPI ネットワークに解析な技術基盤を構築することが可能となった。

課題 2: 精密質量分析装置を用いた疾患発症関連遺伝子の機能解析

上述のように、数多くの蛋白質が DDR に関与しており、また、DDR 関連遺伝子の異常により、多種多様な表現型を示す疾患が発症することが知られている。

症例 1 では、日本人の低身長・小頭症を示す患者のゲノム解析により、疾患発症に関わる候補遺伝子として、脱リン酸化酵素を同定し、精密質量分析装置を用いたインタラクトーム解析を実施した。患者より樹立した線維芽細胞細胞では、当該遺伝子の蛋白質発現は確認されなかった。当該遺伝子の個体レベルでの影響を検討するために、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて、ノックアウトマウスを作製した。当該ノックアウトマウスは雌雄ともに、生後 1 年間は、患者で見られた成長発達障害は確認されず、妊孕能については野生型のマウスと同程度であり、標準的な表現型解析では顕著な異常は観察されなかった。当該ノックアウトマウスマウスについては、今後継続して解析を実施していく予定である。

症例 2 では、全身性の発達遅滞、特徴的顔貌、大頭症を示す、日本人患者 1 名のゲノム解析により、新規の *de novo* *CUL3* 変異 (c.158G > A, p.Ser53Asn) を同定し、精密質量分析装置を用いたインタラクトーム解析により、*CUL3* 蛋白質への変異の影響を明らかにし、論文報告を行った (Kato et al., J Hum Genet 2020)。ゲノム解析により同定した *CUL3* 遺伝子変異 (Polyphen-2: score = 1.000, SIFT: score = 0.001) の病原性を検討するため、HA タグを付加した *CUL3* を細胞内に過剰発現させた後に、HA タグに対する抗体を用いて免疫沈降し、免疫沈降物についてプロテオーム解析を実施した。その結果、BTB (broad-complex, tramtrack and bric-a-brac) 蛋白質と呼ばれる、いくつかのアダプター蛋白質と *CUL3* との相互作用が、患者由来の変異を導入したもの (*CUL3*-S53N) では、野生型と比較して、著しく減弱していることが明らかになった。これらの結果より、当該症例の疾患原因として、*CUL3* とアダプター蛋白質との複合体形成異常が示唆された。

課題 3: DNA 損傷後の POLR2A/RPB1 インタラクトーム解析

ERCC8/CSA もしくは *ERCC6/CSB* の遺伝子変異によって発症する、顕著な低身長・小頭症、早期老化を主徴とするコケイン症候群の患者は、紫外線照射により生じた転写領域の DNA 損傷を修復することができないため (転写共役型ヌクレオチド除去修復の異常)、光線過敏症を示す。*CSA* と *CSB* は RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の最大サブユニットである POLR2A/RPB1 のユビキチン化修飾を制御することで転写共役型ヌクレオチド除去修復に関与するが (Nakazawa et al., Cell 2020)、その詳細な分子機序は明らかになっていない。

本研究課題では、DNA 損傷後の RPB1 のインタラクトーム解析を実施した。RPB1 は C 末端領域に YSPTSPS の 7 アミノ酸からなる繰り返し配列 (CTD リピート) を持っているが、この CTD リピートは、転写反応中に可逆的なリン酸化を受けることが知られている。その中で、転写伸張中の RPB1 は CTD の 2 番目の Ser 残基がリン酸化される。そこで、転写伸張中の RPB1 のインタラクトーム解析を実施するため、CTD の 2 番目の Ser 残基のリン酸化型 RPB1 (RPB1-Ser2) を特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行い、プロテオーム解析サンプルを作製した。また、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術により作製した

CSB 欠損細胞を用いて (*CSB*)、RPB1 のインタラクトーム解析を実施した。その結果、RPB1 以外の RNAPII サブユニットが RPB1-Ser2 の特異的抗体による免疫沈降物に含まれていること、DNA 損傷誘導後に *CSB* ならびに *CSA* の RPB1-Ser2 との相互作用が増加していることから、実験系が機能していることを確認した (表 1)。興味深いことに、DNA 損傷誘導後に、CDC73、PAF1、CTR9、LEO1、WDR61 と RPB1-Ser2 との相互作用が増加すること、その相互作用が、*CSB* 欠損細胞では減弱することが明らかになった。

PAF1 蛋白質は酵母では、Ctr9、Cdc73、Leo1 Rtf1 と複合体を形成し、ヒトでは WDR61 を加えた複合体 (Polymerase-Associated Factor 1 complex: PAF1C) を形成することが知られており、PAF1C は、RNAPII との相互作用を介して、転写の伸長ならびに終結反応に関与していると考えられている (Branden Van Oss et al., Trends Biochem Sci 2017)。

DNA 損傷後に確認された PAF1C と

表1 RPB1-Ser2のインタラクトーム解析

Gene names	# of peptides			
	WT		Δ CSB	
	-	+	-	+
POLR2A	78	67	74	76
POLR2B	45	42	49	49
POLR2C	12	10	12	13
POLR2E	8	8	8	9
POLR2J	4	4	4	4
POLR2D	6	7	8	7
POLR2H	8	7	8	7
POLR2G	7	6	8	8
POLR2I	5	5	6	7
POLR2L	1	2	1	1
POLR2F	4	2	3	3
ERCC6	0	32	0	0
ERCC8	0	5	0	0
CDC73	0	16	0	4
PAF1	0	16	0	3
CTR9	0	7	0	0
LEO1	0	4	0	0
WDR61	0	5	0	2

RPB1-Ser2 との相互作用について、1: PAF1C のどの構成蛋白質が RNAPII との相互作用に重要な

のか、2: CSB 依存的な相互作用であることから、RPB1 のユビキチン化が関与しているのか、3: PAF1C と RNAPII の相互作用に生物学的意義は何か、について今後明らかにしていく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakazawa Y, Hara Y, Oka Y, Komine O, Heuvel D, Guo C, Daigaku Y, Isono M, He Y, Shimada M, Katoh K, Jia N, Hashimoto S, Kotani Y, Miyoshi Y, Tanaka M, Sobue A, Mitsutake N, Suganami T, Masuda A, Ohno K, Nakada S, Mashimo T, Yamanaka K, Luijsterburg M, Ogi T§.	4. 巻 180
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1244.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Marin M, Ramirez MJ, Carmona MA, Jia N, Ogi T, Bogliolo M, Surralles J.	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional Comparison of XPF Missense Mutations Associated to Multiple DNA Repair Disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 60 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10010060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Calmels N, Botta E, Jia N, Fawcett H, Nardo T, Nakazawa Y, Lanzafame M, Moriwaki S, Sugita K, Kubota M, Obringer C, Spitz MA, Stefanini M, Laugel V, Orioli D, Ogi T§, Lehmann A.	4. 巻 55
2. 論文標題 Functional and clinical relevance of novel mutations in a large cohort of patients with Cockayne syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 329 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2017-104877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Doi H, Koyano S, Miyatake S, Nakajima S, Nakazawa Y, Kunii M, Tomita-Katsumoto A, Oda K, Yamaguchi Y, Fukai R, Ikeda S, Kato R, Ogata K, Kubota S, Hayashi N, Takahashi K, Tada M, Tanaka K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Ogi T, Aihara M, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F.	4. 巻 63
2. 論文標題 Cerebellar ataxia-dominant phenotype in patients with ERCC4 mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 417 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0408-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Notaguchi Michitaka, Kurotani Ken-ichi, Sato Yoshikatsu, Tabata Ryo, Kawakatsu Yaichi, Okayasu Koji, Sawai Yu, Okada Ryo, Asahina Masashi, Ichihashi Yasunori, Shirasu Ken, Suzuki Takamasa, Niwa Masaki, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 369
2. 論文標題 Cell-cell adhesion in plant grafting is facilitated by -1,4-glucanases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 698 ~ 702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abc3710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Wakatake Takanori, Ichihashi Yasunori, Okayasu Koji, Sawai Yu, Ogawa Satoshi, Cui Songkui, Suzuki Takamasa, Shirasu Ken, Notaguchi Michitaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Host-parasite tissue adhesion by a secreted type of -1,4-glucanase in the parasitic plant <i>Phtheirospermum japonicum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01143-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honma Yujiro, Adhikari Prakash Babu, Kuwata Keiko, Kagenishi Tomoko, Yokawa Ken, Notaguchi Michitaka, Kurotani Kenichi, Toda Erika, Bessho-Uehara Kanako, Liu Xiaoyan, Zhu Shaowei, Wu Xiaoyan, Kasahara Ryushiro D.	4. 巻 3
2. 論文標題 High-quality sugar production by osgcs1 rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01329-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 RNA polymerase IIのユビキチン化修飾による転写共役修復開始反応の分子機構とその破綻により発症する哺乳類の神経変性のメカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中沢由華, 原雄一郎, 岡泰由, 小峯起, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範史, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 転写共役ヌクレオチド除去修復機構に重要なRNAポリメラーゼユビキチン化部位の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原雄一郎, 中沢由華, 岡泰由, 小峯起, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範史, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 ChIP-seqを利用したDNA損傷およびヌクレオチド除去修復のモニタリング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogi T.
2. 発表標題 Alterations in RNA polymerase II ubiquitination cause Cockayne syndrome-like premature aging phenotype in mice due to TC-NER defect.
3. 学会等名 International Symposium on XP and other Nucleotide Excision Repair Disorders (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakazawa Y, Ogi T.
2. 発表標題 Alterations in RNA polymerase II ubiquitination cause Cockayne syndrome-like premature aging phenotype in mice due to TC-NER defect.
3. 学会等名 International Symposium on XP and other Nucleotide Excision Repair Disorders (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩 朋男.
2. 発表標題 ゲノム不安定性疾患群を中心とした希少難治性疾患の次世代マルチオミクス解析と難病プラットフォーム連携による疾患原因変異の検索.
3. 学会等名 難病プラットフォーム公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩 朋男.
2. 発表標題 DNA損傷依存的なRNAポリメラーゼのユビキチン化修飾の異常はDNA修復経路の欠損マウスで老化表現型を示す.
3. 学会等名 国立遺伝学研究所・研究集会「ゲノムの維持継承を支える分子基盤の包括的理解とその発展」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 泰由, 萩 朋男.
2. 発表標題 マルチオミクス解析により同定した重症アイカルディ・ゴーティエ症候群の分子病態解析.
3. 学会等名 第41回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中沢由華, 萩 朋男.
2. 発表標題 ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患の分子病態.
3. 学会等名 第3回名大医薬系3部局交流シンポジウム～岐阜薬科大学・岐阜大学G-CHAIN・ラクオリア創薬合同シンポジウム～
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩 朋男.
2. 発表標題 RNAポリメラーゼのコピキチン化修飾による転写共役ヌクレオチド除去修復の反応制御とコケイン症候群の病態.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Oka Y, Ogi T.
2. 発表標題 Identification of pathogenic mutations in patients with rare diseases using multiomics approaches.
3. 学会等名 Japanese Proteomics Society 2018 Conference (JPrOS 2018), 9th Asia-Oceania Human Proteome Organization (AOHUP0), and 66th Annual Conference on Mass Spectrometry (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html 名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野HP http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html 名古屋大学生物機能開発利用研究センターHP http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/index.html 名古屋大学生物機能開発利用研究センター 生物産業創出研究室HP http://bbc.agr.nagoya-u.ac.jp/~graft/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡 泰由 (Yasuyoshi Oka) (60762383)	名古屋大学・環境医学研究所・講師 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荻 朋男 (Tomoo Ogi) (80508317)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (13901)	
研究分担者	嶋田 繭子 (Mayuko Shimada) (80623834)	名古屋大学・環境医学研究所・技術補佐員 (13901)	
研究分担者	唐田 清伸 (Kiyonobu Karata) (90345017)	名古屋大学・環境医学研究所・客員研究者 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関