

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19510064

研究課題名 (和文) 転写伸長機構における RNA ポリメラーゼ II の DNA 損傷回避機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of DNA damage avoidance systems by RNA polymerase II on transcription elongation

研究代表者

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

研究成果の概要：転写反応が活性酸素で生じる DNA 損傷に遭遇したときの挙動を解析し、転写における損傷回避機構（損傷乗り越え RNA 合成）を発見した。また色素性乾皮症 A 群結合蛋白質が細胞内で蛋白質複合体を形成し、これがスプライシング因子として機能すること、さらにこれに加えて色素性乾皮症 G 群蛋白質が転写因子と蛋白質複合体を形成し、基本転写に直接関与することを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学

キーワード：DNA 損傷、DNA 修復、突然変異機構、転写機構、

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオチド除去修復機構 (NER) と塩基除去修復機構 (BER) は生体内で生じた DNA 損傷を除去する典型的な 2 つの修復系である。これらの修復系には、2 つの経路が存在することが示唆されている。一つは損傷を受けたゲノム DNA 全体を修復する経路 (GGR)、もう一つは転写が行われている領域の転写鋳型になっている DNA 上の損傷を優先的に修復する経路 (TCR) である。この TCR には NER 及び BER どちらの場合も、一つの中心的モデルが存在する。1) RNA ポリメラーゼ II が、DNA 鋳型領域に生じた DNA 損傷

に出会う。2) RNA ポリメラーゼ II はこの損傷を乗り越えることができずに転写合成を一時停止する。3) RNA ポリメラーゼ II の停止が一つのシグナルとなってそれぞれの損傷にあった修復蛋白質をリクルートし損傷を修復するというものである。

しかしこれらは依然いわゆる一つの作業仮説であり、実際に停止した RNA ポリメラーゼがどんな修復をどのように導くのか、また損傷により導かれた傷害を RNA ポリメラーゼがどのように回避していくのか依然不明な点が多く存在していた。

2. 研究の目的

この研究の目的は、転写において中心的な働きをもつ RNA ポリメラーゼが、損傷に出会ったときにどのような挙動を示すのかを解析することである。

(1) では実際にどのような状況が想定されるか？申請者は、転写側からのアプローチとして RNA ポリメラーゼ II とその転写因子が共役して損傷を乗り越えることを仮定してみた。このような状況は事実複製過程でも観察されていることから、生化学的解析により転写因子の中でそのような活性を持つものを検索した。

(2) また一方、回避するという過程は、当然のことながら転写鎖上の損傷の修復機構とも直接関わると考えられるので、修復蛋白質直接に結合する XAB2 因子の中に転写機構に関わるものを検索した。

(3) さらに色素性乾皮症の臨床症状から、転写に関わると考えられる色素性乾皮症 G 群蛋白質を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

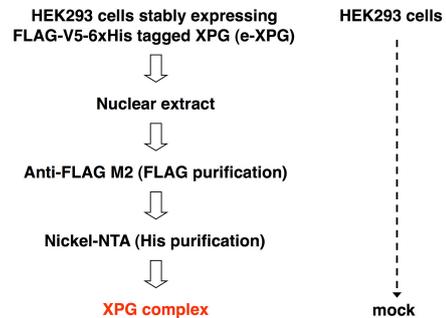
(1) RNA ポリメラーゼによる解析を行うため、転写鎖上に酸化 DNA 損傷を有する転写 DNA 基質を作成し、RNA ポリメラーゼ II の転写伸長反応を観察、損傷において停止することを確認し、その反応にこれまで転写伸長に影響を与えると考えられた転写因子 TFIIS および TFIIF を添加し、さらに転写産物の挙動を観察した。

(2) 修復蛋白質からのアプローチとして、ヌクレオチド除去修復因子色素性乾皮症 A 群蛋白質に結合する XAB2 の蛋白質複合体を XAB2 安定発現細胞株からアフィニティー精製し、その同定される蛋白質の中に転写因子に関わる蛋白質がないかを質量分析およ

びイムノブロット法により検索し、細胞生物学的および生化学的に解析した。

(3) また修復欠損および転写異常が想定される疾患からの解析により、色素性乾皮症 G 群蛋白質を安定発現する細胞を作成し、その細胞から蛋白質複合体を質量分析およびイムノブロット法により同定した。また、その複合体の解析を遺伝学的および生化学的に解析した。

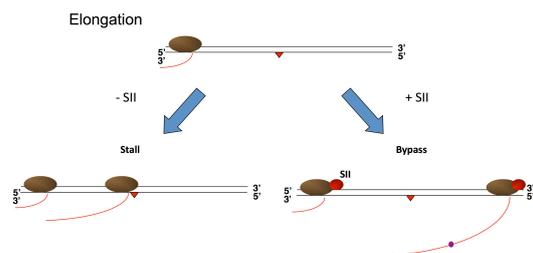
Purification of protein complex containing XPG



4. 研究成果

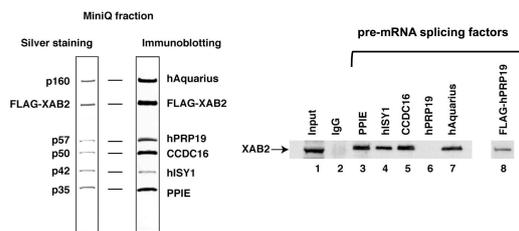
(1) 停止した RNA ポリメラーゼ II (RNA Pol II) は損傷を回避する方法として、損傷を乗り越える可能性を考慮し、転写伸長反応に転写因子を添加した結果、転写伸長因子 TFIIS 存在下で RNA Pol II が 8-オキシグアニン (8-oxoG) を乗り越えることを発見した。この現象は損傷乗り越え合成が転写においても存在していることを示している。

RNA pol II bypasses 8-oxoG



(2) 修復蛋白質の色素性乾皮症 XPA 群蛋白質、コケイン症候群 CSA 群蛋白質、転写因子 RNA ポリメラーゼ II これらの全てに結合できる蛋白質 XAB2 は、細胞抽出液中からアフィニティー精製により複合体として精製された。その複合体を同定した結果、それらの複合体はスプライシングに関与することが示唆された。さらにこの XAB2 複合体は、損傷で停止した RNA ポリメラーゼ II に特異的に蓄積し特に XPA と局在することを見出した。これらのことは転写伸長機構において修復、転写およびスプライシングが共役して機能し、正確な転写反応は多くの役割分担があることを示唆している。

XAB2 is included in the protein complex

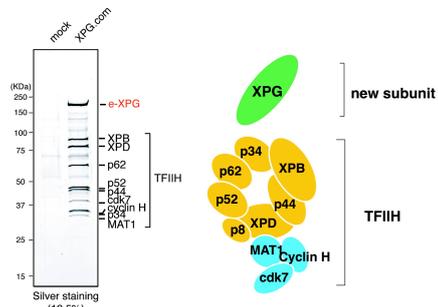


(3) 色素性乾皮症 XPG 群蛋白質を安定発現する細胞を作成し、その細胞からアフィニティー精製により結合蛋白質として XPG 複合体を発見した。その結果、それらの複合体は、色素性乾皮症 XPB 群蛋白質および XPD 群蛋白質を含む基本転写因子 TFIIH であることが明らかとなった。

さらにこの結合は TFIIH 自身の複合体の安定化に関与し、また直接 G 群蛋白質自身が転写機構に関与していることを発見した。

これらの発見は、色素性乾皮症 G 群蛋白質の異常がなぜコケイン症候群を併発するのかという病体をよく説明することができた。

XPGは基本転写因子TFIIHと複合体を形成し転写因子としても機能している



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 7 件)

- ① Kuraoka, I. Effects of DNA lesions on transcription elongation by RNA polymerases. *Genes Environ.* 30: 63-70, 2008. 査読有
- ② Kuraoka, I., Ito, S., Wada, T., Hayashida, M., Lee, L., Saijo, M., Nakatsu, Y., Matsumoto, M., Matsunaga, T., Handa, H., Qin, J., Nakatani, Y., and Tanaka, K. Isolation of XAB2 complex involved in pre-mRNA splicing, transcription, and transcription-coupled repair. *J Biol Chem*, 283: 940-950, 2008. 査読有
- ③ Oda, S., Kuraoka, I., and Maehara, Y. DNA repair as a determinant of tumour chemosensitivity. *Gan To Kagaku Ryoho*, 34: 347-357, 2007. 査読無
- ④ Kuraoka, I., Suzuki, K., Ito, S., Hayashida, M., Kwei, J. S., Ikegami, T., Handa, H., Nakabeppu, Y., and Tanaka, K. RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIH. *DNA Repair (Amst)*, 6: 841-851, 2007. 査読有

- ⑤ Kawanishi, M., Matsukawa, K., Kuraoka, I., Takamura-Enya, T., Totsuka, Y., Matsumoto, Y., Watanabe, M., Zou, Y., Tanaka, K., Sugimura, T., Wakabayashi, K., and Yagi, T. Molecular evidence of the involvement of the nucleotide excision repair (NER) system in the repair of the mono(ADP-ribosyl)ated DNA adduct produced by pierisin-1, an apoptosis-inducing protein from the cabbage butterfly. *Chem Res Toxicol*, 20: 694-700, 2007. 査読有
- ⑥ Ito, S., Kuraoka, I., Chymkowitz, P., Compe, E., Takedachi, A., Ishigami, C., Coin, F., Egly, J. M., and Tanaka, K. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell*, 26: 231-243, 2007. 査読有
- ⑦ Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., and Kamiya, K. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol*, 27: 7028-7040, 2007. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 倉岡 功、田中亀代次 ヒト RNA ポリメラーゼ II 転写反応におけるメチル化 DNA 損傷の影響 第 37 回日本環境変異原学会 2008 年 12 月 5 日 宜野湾
- ② 倉岡 功、田中亀代次 転写およびスプライシングに関与する修復蛋白質 XAB2 複合体の単離 第 51 回日本放射線影響学会 2008 年 11 月 21 日 北九州
- ③ Kuraoka I Effects of methyl DNA

lesions on transcription elongation by RNA polymerase II Gordon Research Conferences (Mutagenesis) 2008 年 7 月 22 日 Oxford

- ④ 倉岡 功、田中亀代次 メチル化による DNA 損傷が RNAPII の転写伸長に与える影響 第 30 回日本分子生物学会 2007 年 12 月 13 日 横浜
- ⑤ 倉岡 功、伊藤 伸介、竹立 新人、石上 智愛、田中 亀代次 色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH と複合体を形成する 第 36 回日本環境変異原学会 2007 年 11 月 30 日 北九州
- ⑥ 倉岡 功、伊藤 伸介、竹立 新人、石上 智愛、田中 亀代次 色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH 複合体の安定化する 第 50 回日本放射線影響学会 2007 年 11 月 15 日 千葉
- ⑦ 倉岡 功、田中亀代次 RNA ポリメラーゼ II 転写伸長反応における DNA 塩基損傷の影響 第 66 回日本癌学会 2007 年 10 月 4 日 横浜
- ⑧ 倉岡 功、伊藤 伸介、竹立 新人、田中亀代次 色素性乾皮症 G 群蛋白質による基本転写因子 TFIIH 複合体の安定化 変異機構研究会第 20 回夏の学校 2007 年 7 月 29 日 名古屋
- ⑨ 倉岡 功、伊藤 伸介、竹立 新人、田中亀代次 色素性乾皮症 G 群蛋白質は基本転写因子 TFIIH と複合体を形成する 第 13 回日本家族性腫瘍学会 2007 年 6 月 16 日 高知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉岡 功 (KURAOKA ISAO)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：60335396

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無