

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04266

研究課題名(和文) DNA損傷部位特異的に集積する転写共役修復因子群を同定・評価する新規技術の開発

研究課題名(英文) Development of new technology to evaluate the transcription-coupling repair factors.

研究代表者

橋本 悟 (Hashimoto, Satoru)

大分大学・理工学部・客員研究員

研究者番号：60352150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：様々な環境要因によってDNAは損傷を受けており、複数の機構によってDNA損傷は修復されている。転写領域において、RNAポリメラーゼがDNA損傷と遭遇することが修復開始のシグナルになることがあるが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。ここで、細胞内におけるDNA損傷とRNAポリメラーゼが遭遇しているゲノム上における部位特異的な現象を評価する実験系が無いことが研究上の大きな課題となっている。本研究計画では、RNAポリメラーゼによる損傷認識機構を解明すべくDNA損傷に衝突したRNAポリメラーゼを評価する新しい実験系の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAポリメラーゼによる損傷認識に伴うDNA修復機構(TCR)の破綻は、コケイン症候群(CS)と紫外線高感受性症候群(UVSS)を来す。CSおよびUVSSともに光線過敏を示すが、CSでは光線過敏以外に認知機能の異常や運動機能障害等、様々な神経症状を有する。ここで、同じTCR機能の異常を原因とする疾患群で異なる臨床像を示すメカニズムについては未解明である。本研究によりTCR機能異常の詳細を明らかにすることが可能となり、CS並びにUVSSの治療法開発に貢献することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Exposure to various environmental factors give rise DNA damage, which is repaired by multiple mechanisms. The encounter of DNA damage by RNA polymerase in the transcription region initiate DNA repair, but the detailed mechanism remains unclear because of the lack of experimental system for evaluating the site-specific phenomenon on the genome where RNA polymerases encounter against DNA damage. In this research project, we aim to develop a new experimental system for evaluating RNA polymerase that encounter against DNA damage in order to elucidate the damage recognition mechanism by RNA polymerase.

研究分野：転写

キーワード：転写

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

太陽光線中の紫外線は、DNA 損傷を誘発することが知られている。DNA 損傷の蓄積はゲノム不安定性を増加し発癌の原因となるため、ヌクレオチド除去修復 (NER) 機構で損傷 DNA は修復される。NER は損傷の認識機構の違いによりゲノム全体の損傷を認識する全ゲノム修復 (GGR) と、転写中の RNA ポリメラーゼ II (PoIII) が損傷を認識して遺伝子領域だけを修復する転写共役修復 (TCR) とに分けられるが、GGR の分子機構が概ね理解されているのに対し、TCR には不明な点が多い。

TCR 機構の破綻はコケイン症候群 (CS) と紫外線高感受性症候群 (UVSS) を来す。CS および UVSS ともに光線過敏を示すが、CS では光線過敏以外に認知機能の異常や運動機能障害等、様々な神経症状を有する。ここで、同じ TCR 機能の異常を原因とする疾患群で異なる臨床像を示すメカニズムについては未解明である。これまでに、DNA 損傷後における PoIII のユビキチン化および分解が、健常者、CS、UVSS 由来の線維芽細胞において異なること、UVSS の原因遺伝子産物である UVSSA が PoIII のユビキチン化に関与することが報告されている。このため DNA 損傷後に起きる PoIII のユビキチン化状態が TCR 異常疾患群の病態に深く関与すると考えられている。

ここで DNA 損傷が発生した細胞内では、UVSSA を含む複数の E3 リガーゼ (CS 複合体、BRCA 複合体、等) によって PoIII がポリユビキチン化される。そして DNA 損傷部位で停止した転写伸長中の PoIII はユビキチンシグナルによる分解を受ける、もしくはバックトラッキング (PoIII が DNA 上をスライドして後退すること) を行い、NER 因子が DNA 損傷部位にアクセスできる空間を創ると考えられている。しかしながら PoIII には様々な状態が存在し (転写開始時、伸長中、および停止時)、DNA 損傷後、どの状態の PoIII にどのようなポリユビキチン鎖 (K48, K63, 他) が形成されるかは十分に理解されていない。

2. 研究の目的

これまでの研究では DNA 損傷部位特異的な PoIII のユビキチン化を検証できていないため、以下の学術的問いを解明することが困難であった。

- (1) 損傷部停止 PoIII は本当にポリユビキチン化しているのか?
- (2) 損傷部停止 PoIII は分解されているのか? バックトラッキングしているのか?
- (3) TCR に関与する未知の因子は存在するか?

上記問いの解明に必要な、DNA 損傷部位で停止した PoIII を認識・評価する“新しい実験系”の確立を、本研究の目的とする。

3. 研究の方法

新しい実験系を構築するに当たり、光架橋性オリゴ CNV シリーズ[®](北海道システムサイエンス)を使用する。光架橋性オリゴは、長波紫外線 (UVA) 照射により相補鎖のチミンと共有結合を形成する CNV-X 塩基を含有する。NLS ペプチドを付加した光応答性オリゴを細胞内に導入して UVA を照射することで、ゲノム配列上の任意の場所に DNA 架橋を作成でき、転写中の PoIII を停止させることが可能となる。この際 NLS にビオチンを付加しておくことで停止した PoIII を認識することができる。

光架橋オリゴが DNA 二重鎖に取り込まれやすいように、転写が活性化しているハウスキーピング遺伝子内の鋳型鎖を認識するオリゴを設計する。その際オリゴの 5' 末端付近には鋳型鎖のチミンに対応する CNV-X 塩基を配置する。また認識配列は 20nt 長で設計し、NLS を付加する 3' 側はスパーサーとして 10nt 長だけ非特異的配列を設け、3' 末端はチオール化を施す。このチオール化合成オリゴとマレイミド化 NLS ペプチドを混合・架橋させ、Sephadex G-25 カラムにて精製を行い実験に用いる。

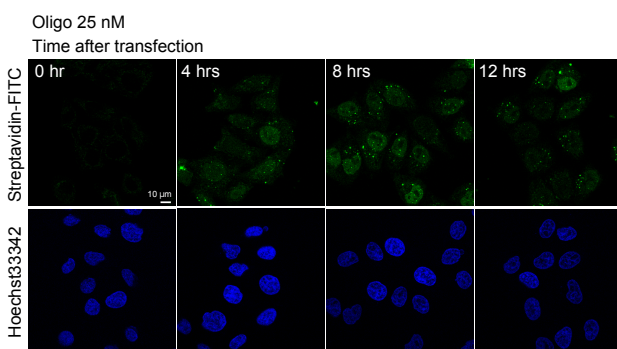
合成した NLS 付加オリゴをリポフェクション法にて細胞内に導入するが、ビオチンを標的とした蛍光染色にて至適導入条件を決定する。光架橋オリゴを導入した細胞に UVA を照射することで部位特異的な DNA 損傷 (架橋) を誘導するが、UVA 照射後、NLS に付加しているビオチンを標的としたクロマチン沈降法および定量的 PCR を実施し、ゲノム DNA と合成オリゴとの架橋効率を検証する。

4. 研究成果

(1) 光架橋オリゴ導入条件の決定：

条件検討には HeLa 細胞を用いた。リポフェクション法によって導入する光架橋オリゴの濃度、および導入後のオリゴの細胞内局在を免疫染色法にて確認した。リポフェクション法には、Lipofectamin RNAiMax を使用した。オリゴはハウスキープ遺伝子である *ACTB* 遺伝子を標的としてデザインしたが、その全長は 33 塩基からなり、5' 末端から 2 番目の塩基に紫外線 (UVA) と反応する CNV 塩基を導入した。RNA の安定性を図るため全ての塩基を S 化し、3' 末端側にはビオチン修飾を施した。導入するオリゴの濃度を決定するために、0 から 200nM までの 6 段階に濃度を設定して細胞内にオリゴを導入した。導入後 18 時間の時点で固定を行い、蛍光染色を行った。25nM から細胞核内の蛍光シグナルが確認され、濃度依存的に蛍光シグナルは強くなった。100nM での導入で核内の蛍光シグナルが非常に強く認められ、それ以上の濃度では 100nM とあまり変化が無かった。またオリゴ濃度を 25nM で導入し、その後のオリゴの細胞内局在を確認したところ、導入後 8 時間の時点で細胞核内の蛍光シグナルが最も強かった (図 1)。以上より、以降の実験で使用するオリゴの濃度は 100nM とし、導入後 8 時間の時点で UVA 照射による部位特異的 DNA 損傷の導入を図ることとした。

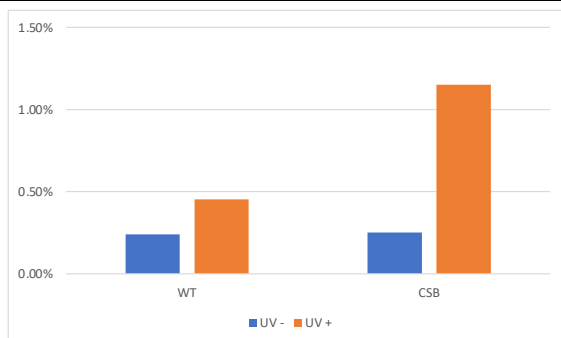
図 1：オリゴ局在の経時的変化



(2) DNA 損傷部位で停止した RNA ポリメラーゼの検出：

DNA 損傷部位で停止した RNA ポリメラーゼを検出すべく、*CSB* 遺伝子をノックアウトした TCR 欠損 HeLa 細胞および、TCR が正常な WT-HeLa 細胞に光架橋オリゴを導入し、UVA にて DNA 損傷を *ACTB* 遺伝子内に誘導させた。その後、細胞をホルマリン固定し、通常のクロマチン免疫沈降法に準じてストレプトアビジン結合磁気ビーズにて RNA ポリメラーゼと結合している分子の複合体を沈降させた。沈降物から断片化した DNA の抽出精製を行い、光架橋オリゴが認識する付近のゲノム DNA 領域を標的としたプライマーで qPCR を実施した。qPCR の結果から、*CSB* ノックアウト HeLa 細胞では誘導 DNA 損傷部位付近に RNA ポリメラーゼが集まっていることが明らかとなり (図 2)、今回開発した実験系が有効であることが示唆された。ここで、DNA 損傷を誘導するに当たり使用した UVA は 200J/m² と比較的低いエネルギー量の照射を行ったが、紫外線による細胞への影響は否定できなかった。このため 0 から 1600J/m² までのエネルギー量の UVA を WT および *CSB* ノックアウト HeLa 細胞に照射し、生存率を確認した。その結果、200J/m² の UVA では細胞の生存率に影響が全く出ないことを明らかとした。現在、RNA 沈降法を用いて、ストレプトアビジンビーズで沈降した RNA ポリメラーゼが内包している RNA の抽出・精製を行い、RNA シークエンスでその配列解析を行っており、これにより TCR 異常のため DNA 損傷部位で停止したままの RNA ポリメラーゼがゲノム DNA 上にてどのような挙動をとるかが明らかになると考えられる。

図 2：DNA 損傷部位で停止した RNA ポリメラーゼの検出



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Satoru, Takanari Hiroki, Compe Emmanuel, Egly Jean-Marc	4. 巻 97
2. 論文標題 Dysregulation of LXR responsive genes contribute to ichthyosis in trichothiodystrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 201-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.01.012	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 Terabayashi Takeshi, Hashimoto Satoru	4. 巻 22
2. 論文標題 Increased unfolded protein responses caused by MED17 mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 neurogenetics	6. 最初と最後の頁 353 ~ 357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10048-021-00661-6	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 Nakazawa Yuka, Hara Yuichiro, Oka Yasuyoshi, et al	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

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, 橋本悟, 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, 橋本悟, 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Isono M., Hashimoto S.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana, New York, NY	5. 総ページ数 10
3. 書名 DNA Fragment Agarose Gel Electrophoresis for Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). In: Hanada K. (eds) DNA Electrophoresis. Methods in Molecular Biology	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	寺林 健 (Terabayashi Takeshi) (40452429)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	岡 泰由 (Oka Yasuyoshi) (60762383)	名古屋大学・環境医学研究所・講師 (13901)	
研究分担者	荻 朋男 (Ogi Tomoo) (80508317)	名古屋大学・環境医学研究所・教授 (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			
フランス	IGBMC			