

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06543

研究課題名(和文) 転写と共役したヌクレオチド除去修復におけるコケイン症候群タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Cockayne syndrome proteins in transcription-coupled nucleotide excision repair

研究代表者

西條 将文 (Saijo, Masafumi)

大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：90221986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写と共役したヌクレオチド除去修復(TC-NER)に関与するタンパク質の機能解析を行い、以下の成果が得られた。(1) C末端欠失CSAはUVSSAには結合せず、VHS領域欠失UVSSAはCSAには結合しなかった。これらの欠失変異体発現細胞は紫外線高感受性を示すことから、CSAとUVSSAの相互作用はTC-NERにおいて重要であることが示された。(2) CSBのクロマチンリモデリング活性あるいはユビキチン結合能を失活させるとCSAやUVSSAとの結合が低下することから、これらの活性が機能に重要であることがわかった。これらの結果により、TC-NERの分子機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

紫外線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のDNA損傷は、DNAの二重らせん構造を歪ませDNAの複製や転写を阻害して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。転写が行われている遺伝子の鋳型鎖上のDNA損傷は、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されるが、それがどのようなメカニズムで起こるのかはまだよくわかっていない。本研究ではこの過程に関与する因子群がどのように相互作用して機能するかについての解析を行い、分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis of proteins involved in transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER) yielded the following results. (1) C-terminal deletion CSA did not bind to UVSSA, and VHS region deletion UVSSA did not bind to CSA. These deletion mutant-expressing cells showed high UV sensitivity, indicating that the interaction between CSA and UVSSA is important in TC-NER. (2) Inactivation of chromatin remodeling activity or ubiquitin-binding ability of CSB reduced its binding to CSA and UVSSA, indicating that these activities are important for its function. These results reveal one aspect of the 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 CSA CSB UVSSA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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て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 の分子メカニズムの研究結果より、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。一方、TC-NER では、転写伸長中の RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が DNA 損傷で停止することが引き金となり損傷部位に呼び寄せられた 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 因子としては、TC-NER を欠損した遺伝性疾患であるコケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) や紫外線高感受性症候群 (UV-sensitive syndrome: UVSS) の原因遺伝子産物 CSA, CSB, UVSSA が明らかになっている。CSA はユビキチンリガーゼ複合体を形成、CSB はクロマチンリモデリング活性を有し、UVSSA は脱ユビキチン化酵素 USP7 と結合する。損傷部位で停止した Pol II にまず CSB が相互作用し、続いて CSA 複合体、UVSSA-USP7 がリクルートされるという順番については分かっているが、集積した因子の機能についてはまだ不明な部分が多く、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のが現状であった。

TC-NER の分子メカニズムを解明するためには、DNA 損傷により Pol II が停止した後でどのように TC-NER 因子がリクルートされるのか？リクルートされた TC-NER 因子はどのように機能するのか？を明らかにする必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、TC-NER 因子である CS タンパク質の機能領域を明確にし、酵素活性とその制御、UV 照射後の修飾および因子間の相互作用の意義を解明することを目的とする。その研究成果により、TC-NER の分子メカニズムの理解が進展すると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 安定発現細胞株の作製

エピトープタグを付加した cDNA を発現ベクターに組み込み、当該遺伝子欠損細胞 (あるいは HeLa 細胞) に導入後、安定発現細胞株を樹立した。

#### (2) 全細胞溶解液、可溶性クロマチン画分の調製

全細胞溶解液は細胞を界面活性剤入り緩衝液に可溶化後に遠心上清を回収して調製した。可溶性クロマチン画分は細胞を界面活性剤入り緩衝液で処理した後の沈殿に DNA 分解酵素を作用させて調製した。紫外線は  $10 \text{ J/m}^2$  あるいは  $20 \text{ J/m}^2$  で照射し、一定時間 (30 分～4 時間) インキュベーション後に細胞を回収した。

#### (3) タンパク質間相互作用の検討

全細胞溶解液あるいは可溶性クロマチン画分よりエピトープタグに対する抗体を使用して目的とするタンパク質を免疫沈降させた。共沈降するタンパク質をそれぞれのタンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロットにより検出した。

#### (4) 紫外線照射後のタンパク質のクロマチンへの結合

タンパク質のクロマチンへの結合は、細胞を界面活性剤入り緩衝液で処理した後の沈殿を標品としてウエスタンブロットにより検定した。

#### (5) 紫外線感受性と TC-NER 能の算定

細胞の紫外線感受性は、前日に播種した細胞に照射量を変えて紫外線を照射 ( $1 \sim 10 \text{ J/m}^2$ ) し 10～14 日後のコロニー形成能により算定した。TC-NER 能は、紫外線照射 16～24 時間後の RNA 合成を  $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みにより測定し、その回復率により算定した。

#### (6) バキュロウイルスによるタンパク質発現系

組換えバキュロウイルスは、Bac-to-Bac システムにより調製した。昆虫培養細胞は Sf9 細胞を使用した。ウイルス感染 3 日後に回収した細胞より全細胞溶解液を調製し、アフィニティ精製を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CSB の解析

CSB が二量体を形成することを示唆する報告 (FEBS J, 2005; DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04844.x.) があり、TC-NER における CSB の機能を探るうえで確認が必要と考えられた。そこで、異なるエピトープタグを付加した CSB を細胞内で発現させて免疫沈降により二量体の形成について検討した。CSB どうしが若干結合しているような実験結果が得られたが、二量体を形成しているとしてもわずかな割合と考えられた。

紫外線を照射した細胞のクロマチン画分での CSB と他の修復関連タンパク質との相互作用を調べるために、異なる DNA 分解酵素を用いて調製したクロマチン画分より免疫沈降を行い、共沈降するタンパク質について比較検討した。標準的な条件としては、Micrococcal Nuclease により調製したクロマチン画分を用い、さらに厳しい条件を検討する時には、Micrococcal Nuclease と Benzonase を併用して調製したクロマチン画分を用いることとした。

CSB は ATP 依存的クロマチンリモデリング活性を有するが、ATPase を失活した CSB は Pol II および CSA との相互作用が低下していた。このことから、TC-NER の過程におけるクロマチンリモデリングの重要性が示唆された。

CSB の C 末端側にはユビキチン結合領域が存在するが、ユビキチン結合能を欠損した CSB は Pol II との相互作用は正常であったが、CSA を含むいくつかの TC-NER 因子との相互作用が低下していた。TC-NER においてユビキチンを介した修復因子間の相互作用が機能する可能性が示された。

##### (2) CSA の解析

CS 患者由来のミスセンス変異をもつ CSA のユビキチンリガーゼ複合体形成能について調べたが、どの変異 CSA タンパク質も複合体を形成しなかった。調べた変異のすべてが WD40 リピート内にあるため、きちんとした  $\beta$ -プロペラ構造を取れないためと考えられた。一方で、UVSS 由来のミスセンス変異をもつ CSA は、野生型 CSA に比べれば少量ではあるが複合体を形成できることがわかり、複合体形成能と臨床症状との相関が示唆された。

CSA の N 末端を欠失させた変異タンパク質は DDB1 と結合できず、ユビキチンリガーゼ複合体を形成しなかった。N 末端欠失 CSA 発現細胞は紫外線高感受性を示し、紫外線照射後の RNA 合成の回復も見られないことから、CSA ユビキチンリガーゼ複合体の機能が TC-NER において必要であることが示された。

C 末端を欠失させた変異 CSA は DDB1 と結合し、ユビキチンリガーゼ複合体を形成した。C 末端欠失 CSA を欠損細胞で発現させると紫外線高感受性を示し、紫外線照射後の RNA 合成の回復も見られなかった。また、欠失領域内では酸性アミノ酸残基のクラスターが保存されており、保存されたアミノ酸残基の置換体でも欠失体と同様の紫外線高感受性を示した。

C 末端欠失 CSA は野生型 CSA と同様に紫外線照射後クロマチンに結合し、CSB と相互作用したが、UVSSA とは結合しなかった。

一方で、可溶性画分では、UVSSA と結合できない C 末端欠失 CSA は紫外線照射直後から量が減少することがわかった。UVSSA 欠損細胞では野生型 CSA も紫外線照射後に量の減少が観察された。プロテアソーム阻害剤を添加して照射すると CSA の減少が抑えられたので、この量の減少はプロテアソームによる分解であることがわかったが、その意義は現段階では不明である。

##### (3) UVSSA の解析

UVSSA は紫外線高感受性症候群の原因遺伝子産物であり、中央部で USP7 と結合する。その領域より C 末端側の領域 (DUF2043 領域と C 末端領域) を欠損させると発現細胞は紫外線高感受性を示すことから、これらの領域が TC-NER において何らかの役割を担っていることが示された。

UVSSA の N 末端の VHS 領域を欠損させると CSA には結合しなかった。しかし、VHS 領域のみでは野生型 UVSSA と比較して CSA の結合量が少ないことから、UVSSA の VHS 領域は CSA との結合に必須であるが他の領域も結合に関与する可能性が示唆された。

VHS 領域を欠失させた UVSSA を欠損細胞で発現させると紫外線高感受性を示したことから、CSA と UVSSA の相互作用が TC-NER において重要であることが示唆された。

紫外線照射後 UVSSA はクロマチンに結合するが、VHS 領域欠失 UVSSA は結合しなかった。この結果より、UVSSA は CSA との結合を介してクロマチンに結合することが示唆された。

##### (4) TC-NER 関連因子調製方法の確立

TC-NER の分子機構を明らかにするためには、CSA 複合体、CSB、UVSSA の精製標品の調製が必要

である。野生型と各種変異体にエピトープタグを付加し、CSA については CSA 欠損細胞あるいは HeLa 細胞に発現プラスミドを導入、CSB, UVSSA については組換えバキュロウィルスを作製し昆虫培養細胞に感染させ、各タンパク質を発現させた。それらのタンパク質(複合体)をエピトープタグのアフィニティ精製やゲルろ過により精製し、高純度のサンプルが得られる精製方法を確立した。精製標品で、CSA 複合体はユビキチンリガーゼ活性、CSB は DNA 依存的 ATPase 活性を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakasai R, Wakasugi M, Matsui T, Sunatani Y, Saijo M, Matsunaga T, Iwabuchi K	4. 巻 113
2. 論文標題 Camptothecin compromises transcription recovery and cell survival against cisplatin and ultraviolet irradiation regardless of transcription-coupled nucleotide excision repair.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	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） 10.1016/j.dnarep.2022.103318	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------