

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	RNAポリメラーゼ共通サブユニットRPB6と基本転写因子TFIIHの相互作用の構造機能解析
Title(English)	
著者(和文)	諏訪哲史
Author(English)	Tetsufumi Suwa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11720号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 雄輝,徳永 万喜洋,木村 宏,相澤 康則,白木 伸明
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11720号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和3年度 学位論文

RNAポリメラーゼ共通サブユニット RPB6 と基本転写因子
TFIIH の相互作用の構造機能解析

東京工業大学
生命理工学院
生命理工学コース

諏訪哲史

指導教員 山口雄輝 教授

目次

目次.....	1
略語一覧.....	4
第 1 章 序論.....	5
1.1 緒言.....	5
1.2 本研究の背景.....	6
1.2.1 真核生物の 3 つの RNAP と共通サブユニット RPB6.....	6
1.2.2 基本転写因子 TFIIH.....	6
1.2.3 TFIIH の多機能性と p62-PH-D を介した相互作用.....	7
1.2.4 TFIIH-p62 PH-D と RPB6 の相互作用の構造.....	8
1.3 本研究の目的.....	9
1.4 図表.....	10
第 2 章 RPB6-TFIIH の相互作用と細胞増殖.....	17
2.1 緒言.....	17
2.2 材料と方法.....	18
2.2.1 細胞の培養.....	18
2.2.2 内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターの作製.....	18
2.2.3 野生型または変異型 RPB6 を発現させるレンチウイルスベクターの作製.....	18
2.2.4 RPB6 をノックダウンする、または発現させるレンチウイルスの調製.....	18
2.2.5 野生型または変異型 RPB6 の発現と内在の RPB6 のノックダウン.....	19
2.2.6 TotalRNA の抽出と定量 RT-PCR を用いた転写産物量の定量.....	19
2.2.7 内在と外来の RPB6 の定量に用いたプライマー.....	19
2.2.8 内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞の生存率の測定.....	20
2.2.9 ウェスタンブロッティングを用いた RPB6 の発現量解析.....	21
2.2.10 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞の増殖曲線と倍加時間の算出.....	22
2.3 結果.....	23
2.3.1 RPB6 は細胞の生存に重要である.....	23
2.3.2 野生型 RPB6 は細胞増殖に関して内在の RPB6 を代替している.....	23
2.2.3 内在の RPB6 を野生型または変異型 RPB6 で『置換』した細胞を樹立できた...24	24

2.3.4 RPB6-TFIIH の相互作用は細胞の増殖において重要である.....	24
2.4 本章のまとめ.....	26
2.5 図表.....	27
第3章 RPB6-TFIIH の相互作用と転写反応.....	33
3.1 緒言.....	33
3.2 材料と方法.....	34
3.2.1 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞における転写産物量の定量.....	34
3.2.2 RNAPI と RNAPII、RNAPIII が転写を担う遺伝子に対するプライマーの設計.....	34
3.2.3 RNA-seq を用いた mRNA の網羅的発現量解析.....	35
3.3 結果.....	36
3.3.1 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI の転写反応に重要である.....	36
3.3.2 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPII の転写反応に重要である.....	36
3.3.3 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPIII の転写反応に重要である.....	37
3.4 本章のまとめ.....	38
3.5 図表.....	39
第4章 RPB6-TFIIH の相互作用と NER.....	44
4.1 緒言.....	44
4.2 材料と方法.....	45
4.2.1 細胞への紫外線の照射と細胞生存率の測定.....	45
4.2.2 細胞への白金製剤シスプラチンの処理と細胞生存率の測定.....	45
4.2.3 蛍光イメージングによる UDS および RRS の測定.....	45
4.2.4 定量 PCR を用いた個々の遺伝子における RRS の測定.....	47
4.3 結果.....	48
4.3.1 RPB6-TFIIH の相互作用は NER に重要である.....	48
4.3.2 RPB6-TFIIH の相互作用は全ゲノム NER に必須ではないが関与している.....	48
4.3.3 RPB6-TFIIH の相互作用は転写共役型 NER において重要である.....	59
4.3.4 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI と RNAPII の転写共役型 NER に重要である.....	59
4.4 本章のまとめ.....	51
4.5 図表.....	52

第5章 変異型 RPB6 発現細胞で見られた表現型の変化の因果関係.....	58
5.1 緒言.....	58
5.2 材料と方法.....	59
5.2.1 RNAPI 阻害剤 BMH21 を用いた遺伝学的解析.....	59
5.2.2 RNAPIII 阻害剤 ML60218 を用いた遺伝学的解析.....	59
5.2.3 活性酸素種除去剤 N-アセチル-L-システインを用いた遺伝学的解析.....	59
5.3 結果.....	61
5.3.1 RNAPI の転写産物の減少は細胞の増殖に影響を与えない.....	61
5.3.2 RNAPI の転写産物の減少は NER の機能欠損に関与しない.....	61
5.3.3 RNAPIII の転写産物の減少は細胞増殖を阻害する.....	61
5.3.4 RNAPIII の転写産物の減少は NER の機能欠損に関与しない.....	62
5.3.5 Essencial 遺伝子の発現量の低下が細胞増殖速度鈍化の原因の1つである.....	62
5.3.6 NER の機能欠損は関連遺伝子の発現量の変化が原因ではない.....	62
5.3.7 NER の機能欠損は細胞増殖速度鈍化の原因の1つである.....	63
5.3.8 NER の機能欠損は転写産物量の変化の原因ではない.....	63
5.4 本章のまとめ.....	64
5.5 図表.....	65
第6章 まとめと考察.....	71
6.1 緒言.....	71
6.2 RPB6 の天然変性領域に相互作用する TFIIH 以外の因子.....	72
6.3 RPB6-TFIIH の相互作用の転写に果たす役割.....	73
6.4 RPB6-TFIIH の相互作用の転写共役型 NER に果たす役割.....	74
6.4.1 RNAPI と RNAPIII における転写共役型 NER の存在可能性.....	74
6.4.2 RPB6-TFIIH の相互作用の転写共役型 NER への関与モデル.....	74
6.4.3 脊椎動物以外の種における RPB6-TFIIH の相互作用と転写共役型 NER.....	75
6.5 図表.....	76
参考文献.....	78

略語一覧

CTD	C-terminal domain
EdU	5-ethynyl-2-deoxyuridine
EU	5-ethynyluridine
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False discovery rate
GSEA	Gene set enrichment analysis
IDR	Intrinsically disordered region、天然変性領域
ITC	Isothermal titration calorimetry、等温滴定型カロリメトリー
K_d	dissociation constant、解離定数
NAC	N-acetyl-L-cysteine、N-アセチル-L-システイン
NER	Nucleotide excision repair、ヌクレオチド除去修復
NMR	Nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴
PBS	phosphate buffered-saline
PH-D	Pleckstrin homology domain
ROS	Reactive oxygen species、活性酸素種
RNAP	RNA polymerase、RNA ポリメラーゼ
RRS	Recovery of RNA synthesis
shRNA	short hairpin RNA、ショートヘアピン RNA
TBS	Tris-buffered saline、トリス緩衝生理食塩水
UDS	Unscheduled DNA synthesis

第 1 章 序論

1.1 緒言

成人のヒトの体はおよそ 37 兆個の細胞から構成されており、それらの細胞は存在する位置によって、筋肉細胞や神経細胞など異なる性質を持っている。しかし、それらのすべての細胞は、30 億塩基対からなり約 21,000 種類の遺伝子をコードしている、同じ塩基配列のゲノムを有している。つまり、これら細胞種間の表現型の違いはゲノムの塩基配列ではなく、その細胞内で発現している遺伝子の違いによって起こっている。さらに、細胞の種類によらない必須の生命現象も遺伝子の機能によって起こっている。それゆえ、遺伝子の発現制御機構を明らかにすることは、単なる核内反応に関する知見の蓄積にはとどまらず、生命そのものの本質的な理解において極めて重要な研究であると言える。

遺伝子の発現は、ゲノム DNA の配列の情報を RNA に写し取る転写反応と、RNA の情報をもとに対応するアミノ酸を連結させ、タンパク質を合成する翻訳反応の 2 つから成り立っている。転写反応はセントラルドグマの最初のステップであり、遺伝子発現の律速段階となることも多く、それ以降のどのステップよりも遺伝子の発現に重要であると考えられている。この転写反応を制御している機構を明らかにする方法の 1 つは、転写因子の機能を調べることである。ヒトには約 2,000 種類の転写因子が存在しており、単なる転写の制御だけでなく、発生や細胞間シグナル伝達への応答、細胞周期の調節など、その役割は多岐にわたっている。転写因子に関する研究では、転写因子の転写活性化能や、ゲノム DNA との結合能、RNA ポリメラーゼとの結合能など、分子的な機能解析を通じて転写制御機構を解明しようという試みが世界中で行われてきた。

本研究では、すべての RNA ポリメラーゼ (RNAP) に共通するサブユニットの 1 つである RPB6 と、基本転写因子でありヌクレオチド除去修復 (NER) においても重要な因子である TFIIH の相互作用に注目し、その機能解析を行った。この相互作用の機能を明らかにすることができれば、全 RNAP の転写反応や、NER の分子メカニズムの解明につながる可能性がある。この研究を通じて私は、なぜ全 RNAP が RPB6 を共有しているのかという根本的な問いに答え、転写と NER に関する研究を大きく前進させることを目指した。

1.2 本研究の背景

1.2.1 真核生物の3つのRNAPと共通サブユニットRPB6

我々ヒトを含む真核生物では3種類のRNAP(RNAPI、RNAPII、RNAPIII)が転写を担っている(図1-1)。RNAPIはリボソームRNA(rRNA)を、RNAPIIはメッセンジャーRNA(mRNA)と多くの核内低分子RNAを、RNAPIIIはトランスファーRNA(tRNA)とその他の低分子RNAを転写している。どのRNAPも12個を超えるサブユニットから構成されているが、これらは進化的に同一の起源を有しているため類似した構造を持っており、5つのサブユニット(RPB5、RBP6、RBP8、RBP10、RBP12)を共有している[1]。

RNAPに関する研究は世界中で盛んに行われており、RNAPによる転写反応の分子メカニズムの詳細も解明されつつある。近年では、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析によって、RNAPの構造の細部まで分かるようになってきている。しかし、これら手法による構造解析にも限界が存在する。例えばRNAPIIには、クライオ電子顕微鏡法において構造を定めることが出来ない天然変性領域と呼ばれる領域が存在する(図1-2)[2]。バクテリアのRNAPの β' サブユニットのオーソログであるRBP1には、そのC末端に天然変性領域が存在する。この領域はC-terminal domain(CTD)と呼ばれており、様々な転写因子やRNAプロセッシング因子が相互作用する領域としてよく知られている[3]。このCTDは種によって繰り返しの回数は違えど(ヒトは52回、ショウジョウバエは45回、出芽酵母は26回)YSPTSPSの7つのアミノ酸の反復構造から構成されており、そのリン酸化が転写反応の各段階の制御に重要であることがよく知られている[4]。本研究で注目したRBP6にも、RBP1のCTDに次いで長い天然変性領域が、そのN末端に存在する[5]。RBP6はバクテリアのRNAPの ω サブユニットのオーソログであり、そのアミノ酸配列は様々な種間で高度に保存されている(図1-3)。RBP6はRNAPのアセンブリに重要であると言われているが[6]、RBP6固有の機能はほとんど明らかになっていない。また、RBP6のN末端の天然変性領域の機能も明らかになっていない。

1.2.2 基本転写因子TFIIH

基本転写因子TFIIHは10個のサブユニットからなる複合体で、ヘリカーゼ活性を持つサブユニット(XPB、XPD)と、RBP1のCTDへのキナーゼ活性を持つサブユニット(Cyclin

H、CDK7、MAT1)、複合体のコアとなるサブユニット (p8、p34、p44、p52、p62) から構成されている (図 1-4A) [7]。TFIIH は RNAPII の転写開始において、RNAPII と TFIIB、TFIID、TFIIE、TFIIF と共に、RNAPII の転写開始に必須である転写開始前複合体を形成する (図 1-4B) [8]。この転写開始前複合体において TFIIH は TFIIE と相互作用しており、この TFIIE は TFIIH のキナーゼ活性とヘリカーゼ活性を制御していることが分かっている [8]。これら TFIIH の酵素活性はプロモーター領域の DNA オープニングや、RNAPII のプロモータークリアランスに重要であることも分かっている。

また、TFIIH は DNA 損傷修復のひとつである NER においても重要な役割を担っている (図 1-5) [10]。NER は DNA 二重らせん構造の歪みを認識し、その原因となる損傷の切除と修復を行うことで遺伝子に変異が入るのを防ぐ非常に重要な機構である。DNA 二重らせん構造の歪みをもたらす損傷には、紫外線が誘導するシクロブタン型ピリミジンダイマーや 6-4 型光産物と、白金製剤シスプラチンやオキサリプラチンなどの化合物による DNA 鎖間の架橋などが存在する [11]。この NER には全ゲノム NER と転写共役型 NER という損傷の認識方法が異なる 2 つの経路が存在する [12]。全ゲノム NER では、DDB1-DDB2 複合体と XPC-RAD23B-Centrin-2 複合体によってゲノム上の損傷がランダムに認識され、その後 TFIIH が損傷部位にリクルートされてくる。一方、転写共役型 NER では転写伸長中の RNAPII が DNA 損傷に遭遇し一時停止することで損傷が認識され、その後 TFIIH がリクルートされてくる。損傷部位にリクルートされてきた TFIIH は、損傷部位の切除に際して DNA オープニングを行う。その後、損傷部位の切除と切除された部位の修復合成が行われる。TFIIH は全ゲノム NER の過程において色素性乾皮症の原因遺伝子である XPC と、転写共役型 NER の過程において紫外線高感受性症候群の原因遺伝子である UVSSA と相互作用していることが知られている [13,14]。

1.2.3 TFIIH の多機能性と p62 PH-D を介した相互作用

TFIIH は転写開始と NER 以外にも、転写の活性化や細胞周期の制御などにも関与している。このような TFIIH の多機能性は TFIIH のコアサブユニット p62 の Pleckstrin homology ドメイン (PH-D) と、様々な因子の相互作用によって発揮されている (図 1-6A) [15]。PH-D はリン脂質であるホスファチジルイノシトールのリン酸基と高い親和性をもって結合す

ることが知られており、細胞内動態や細胞情報伝達などに関わるシグナル伝達タンパク質に多く存在している [16]。p62 PH-D は、TFIIIE の α サブユニットや、XPC、UVSSA に加えて、がん抑制遺伝子産物である p53 や転写因子 DP1 とともに、これら因子の天然変性領域を介して相互作用することが分かっている [17,18]。これら TFIIH-p62 PH-D の相互作用因子の天然変性領域には、酸性アミノ酸クラスターの中に相互作用に重要な芳香族アミノ酸残基が存在するという配列相同性が存在する (図 1-6B)。この配列相同性は RPB6 の天然変性領域にも存在しており、RPB6 が TFIIH の新規相互作用因子である可能性が考えられた。

1.2.4 TFIIH-p62 PH-D と RPB6 の相互作用の構造

RPB6 の天然変性領域には、TFIIH-p62 PH-D の相互作用因子に共通する特徴が存在した。そこで両者が実際に相互作用するのか明らかにするため、核磁気共鳴 (NMR) を用いた構造解析が本研究の共同研究先で行われた。具体的には、大腸菌で発現させた TFIIH-p62 の PH-D (108 aa) と RPB6 (127 aa) の相互作用を NMR を用いて解析した。その結果、TFIIH-p62 PH-D と RPB6 が相互作用している構造を明らかにすることができた (図 1-7A) [19]。

次に、TFIIH-p62 PH-D との相互作用に重要な RPB6 のアミノ酸を特定するため、RPB6 のアミノ酸置換体と p62 PH-D の解離定数 (K_d) の等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いた測定が行われた。共同研究開始当初、相互作用に重要な RPB6 のアミノ酸は TFIIH の他の相互作用因子の配列相同性から、13 番目のフェニルアラニン (Phe) だと考えられていた。しかし、13 番目の Phe をアラニン (Ala) に置換した変異体を用いた当研究室における遺伝学的解析において、野生型 RPB6 と表現型にほとんど差異が見いだせなかった。この結果から、近傍にある 8 番目の Phe も相互作用に重要なのではないかと我々は考えた。そこで ITC 解析には、8 番目と 13 番目の Phe をそれぞれ Ala に置換した F8A 変異体と F13A 変異体、そして両方を置換した F8A/F13A 変異体を使用した。その結果、F13A と p62 PH-D の K_d は野生型 RPB6 との K_d に比べ大きく、結合親和性が 1/6 に低下することが分かった (図 1-7B) [19]。また F8A と p62 PH-D の K_d は、野生型 RPB6 との K_d とほぼ変わらなかった。さらに F8A/F13A と p62 PH-D は結合しないことも分かった。これらの結果から、RPB6 と TFIIH-p62 PH-D の結合には、13 番目の Phe が最も重要であり、8 番目の Phe も結合に補助的な役割を果たしていることが分かった。

1.3 本研究の目的

全 RNAP に共通するサブユニットである RPB6 の天然変性領域と、基本転写因子であり NER においても重要な因子である TFIIH のコアサブユニット p62 の PH-D が相互作用することは、生化学的な解析から明らかになっている (図 1-7)。しかし、その結合が実際に細胞内においても起こっているのか、またその相互作用の機能的な意義は何であるのか分かっていない。RPB6 は全 RNAP に存在するので、RPB6 と TFIIH の相互作用は全 RNAP による転写反応や、TFIIH が重要な役割を果たしている NER、特に転写共役型 NER に関与している可能性がある。そもそも TFIIH は RNAPII の転写開始に関与する因子であると考えられており [8]、RNAPII による転写の他のステップや、他の RNAP の転写反応に関与しているのか、はっきりしたことはこれまで分かっていない。しかし、全 RNAP に共通するサブユニットである RPB6 との相互作用を介して、RNAPII による転写反応の開始段階以外のステップや、他の RNAP の転写反応に TFIIH が関与していることも考えられる。また、そもそも転写共役型 NER は RNAPII の転写においてのみ起こる反応であると考えられているが [12]、RPB6 を介して全 RNAP と TFIIH が相互作用するのであれば、転写共役型 NER が RNAPI や RNAPIII の転写においても起こっている可能性がある。そこで本研究では、RPB6-TFIIH の相互作用が細胞内でも起こっているのか、またその機能的な意義は何であるのか明らかにするとともに、先に挙げたいくつかの可能性を検証するため様々な実験を行った。

1.4 図表

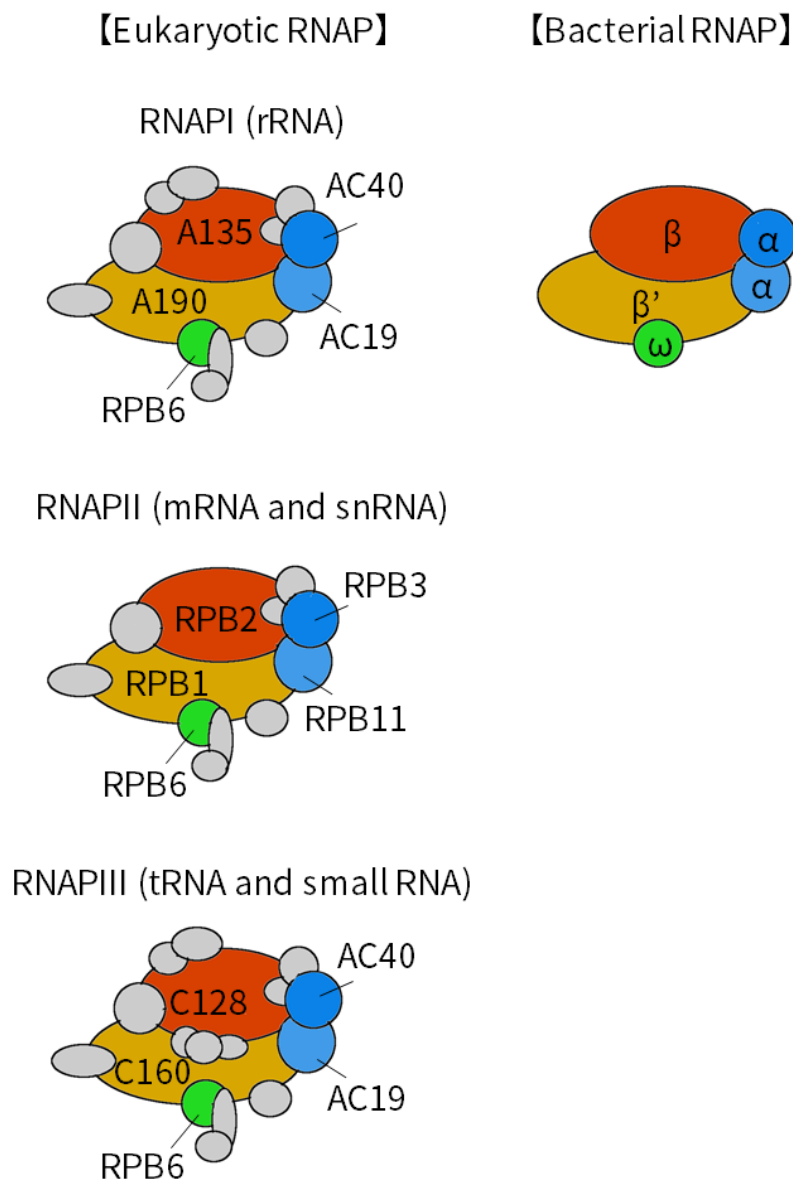


図 1-1 真核生物の RNAP とバクテリアの RNAP

真核生物が有する 3 種類の RNAP (RNAPI、RNAPII、RNAPIII) の構成とバクテリアの RNAP の構成を示した。真核生物の RNAP は、いずれも 12 を超えるサブユニットから構成されており、図中に明示はしていないが 5 つのサブユニットを共有している。バクテリアの RNAP のサブユニットと、そのオーソログである真核生物の RNAP のサブユニットは同じ色を用いて表現している。

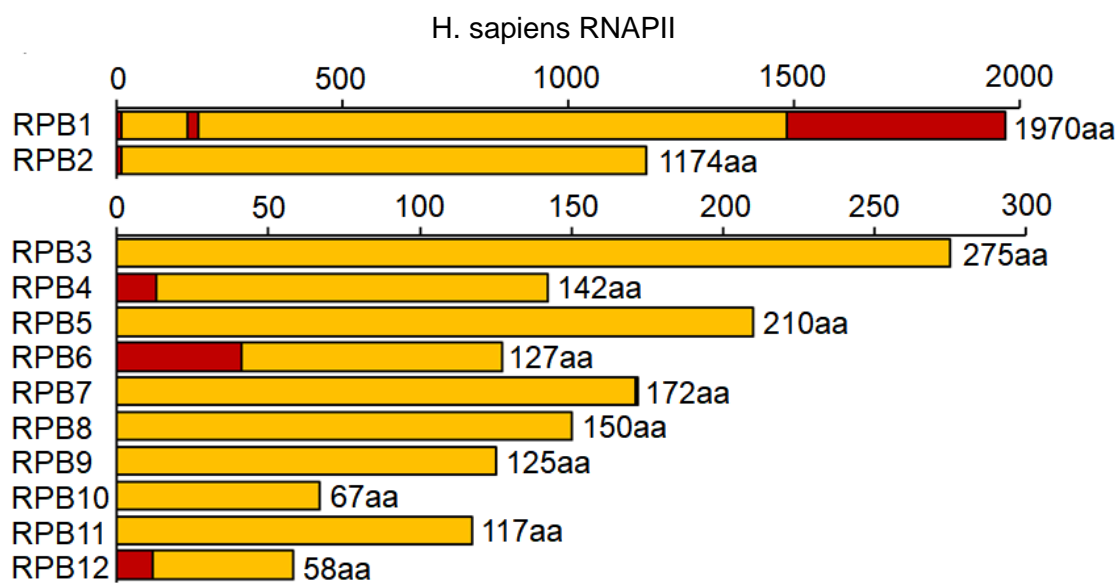


図 1-2 クライオ電子顕微鏡によって構造を定めることができない RNAPII の領域

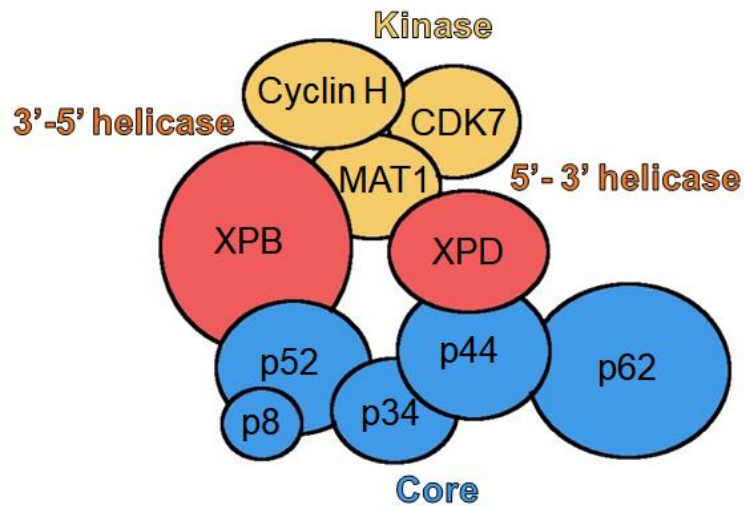
クライオ電子顕微鏡による解析 (PDB ID: 5IY6) において、構造が一意に定まっていないヒトの RNAPII の領域を赤色で、定まる領域を黄色でサブユニットごとに示した。さらに、棒グラフの右に全長のアミノ酸数も示した。

Intrinsically disordered region (IDR)		
<i>H.sapiens</i>	1 MS..... DNEDN FDGDDFDDV EEDEGLDDLENA EE	30
<i>B.taurus</i>	1 MS..... DNEDN FDGDDFDDV EEDEGLDDLENA EE	30
<i>S.scrofa</i>	1 MS..... DNEDN FDGDDFDDV EEDEGLDDLENA EE	30
<i>M.musculus</i>	1 MS..... DNEDN FDGDDFDDV EEDEGLDDLENA EE	30
<i>D.melanogaster</i>	1 MDDAD Y DNDD VGGDDFDDV DEDDVDEDINQ EE EA	33
<i>C.elegans</i>	1 MADEDDYQDM DNDD F VDDNEMEDVI EEDPQRPDNEDE DD	39
<i>S.pombe</i>	1 MSDYEE D E AFG MDGAVMEEEV DELEMI DENGQSQQGV SHPG EP	43
<i>S.cerevisiae</i>	1 MSDYEEAFN DGNENF EDFVEHFS DEETYEEK QFKDGETT DANGKTIVTGGN	53
<i>A.thaliana</i>	1 MADED Y N DVDD LG YEDEPAEPEI EEGVEEDVEMKEN DD	38
IDR		
<i>H.sapiens</i>	31 EGQENVEILPS GERPQANQKRITTPYMTKY ERARVLGTRALQIAM CAPV	79
<i>B.taurus</i>	31 EGQVNV EILPS GERPQANQKRITTPYMTKY ERARVLGTRALQIAM CAPV	79
<i>S.scrofa</i>	31 EGQENVEILPS GERPQANQKRITTPYMTKY ERARVLGTRALQIAM CAPV	79
<i>M.musculus</i>	31 EGQENVEILPS GERPQANQKRITTPYMTKY ERARVLGTRALQIAM CAPV	79
<i>D.melanogaster</i>	34 DNIEIIAPGGA GGGGVPKSKRITTKYMTKY ERARVLGTRALQIAM CAPI	82
<i>C.elegans</i>	40 DNVDENFEL FD QGKAVPTSE HVTTPFMTKY ERARVLGTRALQIAM GAPV	88
<i>S.pombe</i>	44 STTVIT EDVASSKTAQ SGKAVAK EDRTTTPYMTKY ERARILGTRALQISM NAPV	97
<i>S.cerevisiae</i>	54 GP EDFQQHE QIRRKTLK EKAIPK DQRATTPYMTKY ERARILGTRALQISM NAPV	107
<i>A.thaliana</i>	39 VNGEPI EAEDK VE TEPVQRPRKTSK FMTKY ERARILGTRALQISM NAPV	87
<i>H.sapiens</i>	80 MVELEGETDPLLIAMKE LKARKIPIIIRRYLP DGSYEDWGV DELIITD	127
<i>B.taurus</i>	80 MVELEGETDPLLIAMKE LKARKIPIIIRRYLP DGSYEDWGV DELIITD	127
<i>S.scrofa</i>	80 MVELEGETDPLLIAMKE LKARKIPIIIRRYLP DGSYEDWGV DELIISD	127
<i>M.musculus</i>	80 MVELEGETDPLLIAMKE LKARKIPIIIRRYLP DGSYEDWGV DELIISD	127
<i>D.melanogaster</i>	83 MVELDGETDPLQIAMKE LKQKKIPIIIRRYLP DHSYEDWSI DELIMVDN	131
<i>C.elegans</i>	89 MVELEGETDPL EIARK ELKQRRIP IIVRRYLP DGSYEDWPT DQLQLADW	137
<i>S.pombe</i>	98 LVDLEGETDPLQIAMKE LAQKKIPL LVRRYLP DGSYEDWSVA ELI	142
<i>S.cerevisiae</i>	108 FVDLEGETDPLRIAMKE LA EKKIPL VIRRYLP DGSFEDWSV EELIVDL	155
<i>A.thaliana</i>	88 MVELEGETDPL EIAMKE LRQRKIP FTIRRYLP DGSFE EWGV DELIVEDS WKRQVGGD	144

図 1-3 様々な生物種における RPB6 のアミノ酸配列

様々な生物種における RPB6 のアミノ酸配列を相同性に基づき整理した。左に生物種を、右にその生物種における全長の RPB6 の配列を示している。天然変性領域 (IDR) に相当する領域を上線を用いて示した。また、酸性アミノ酸は赤色の文字で、芳香族アミノ酸は緑色の文字で表現した。

A



B

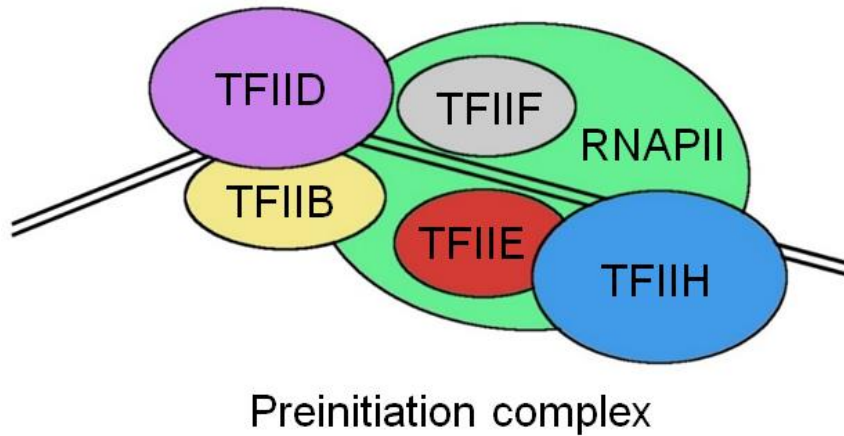


図 1-4 基本転写因子 TFIID の構造と転写開始前複合体の構造

(A) 基本転写因子 TFIID 複合体の構造の模式図を示した。TFIID は 10 個のサブユニットからなる複合体でキナーゼ活性を持つサブユニット (黄色) と、ヘリカーゼ活性を持つサブユニット (赤色)、複合体のコアとなるサブユニット (青色) から構成されている。(B) DNA 上に形成された転写開始前複合体の模式図を示した。転写開始前複合体において TFIIE (赤色) の α サブユニットと TFIIH (青色) が相互作用していることが、すでに分かっている。

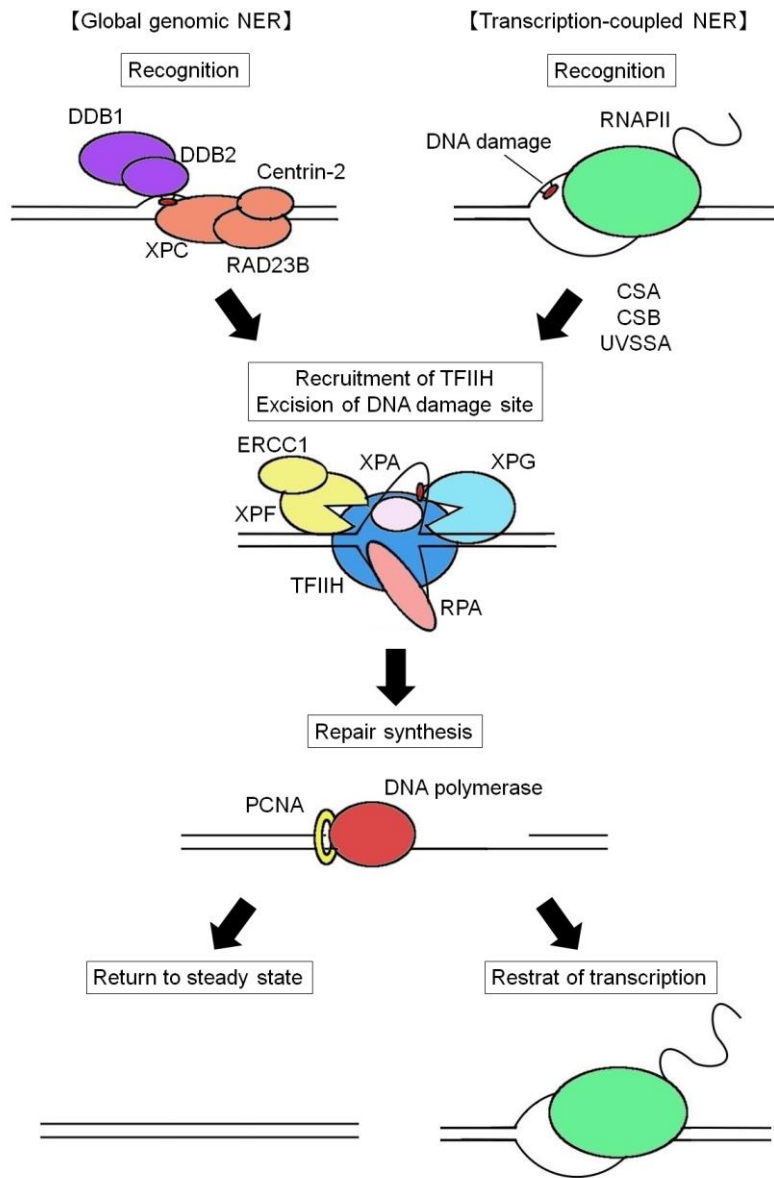
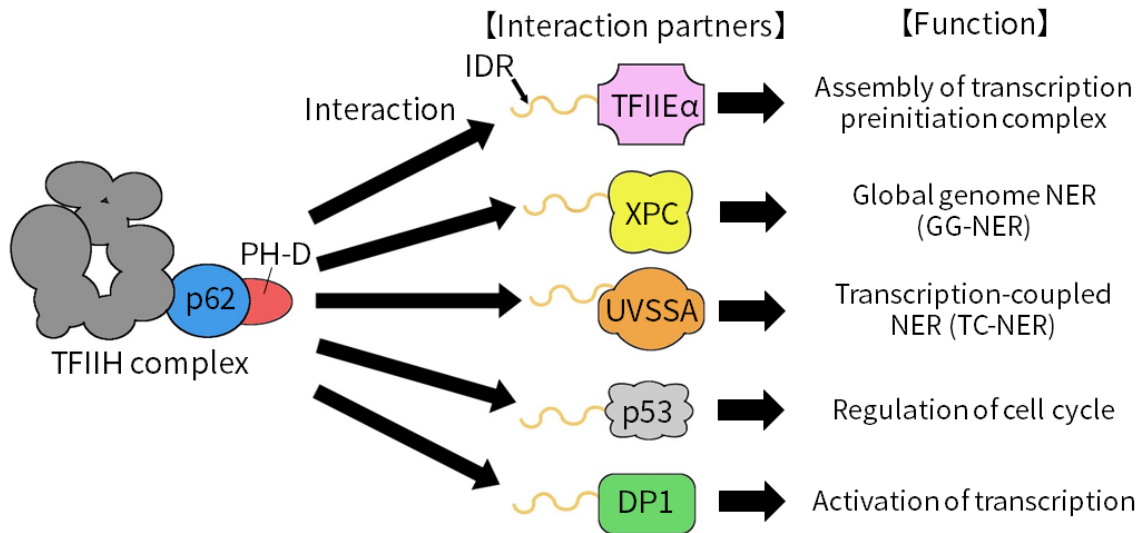


図 1-5 全ゲノム NER と転写共役型 NER の模式図

NER は損傷の認識に方法によって、全ゲノム NER (左) と転写共役型 NER (右) の 2 つに分類される。全ゲノム NER では DDB1-DDB2 複合体と XPC-RAD23B-Centrin-2 複合体によって損傷が認識され、TFIIH が損傷部位にリクルートされる。転写共役型 NER では転写伸長中の RNAPII が損傷を認識し、CSA や CSB、UVSSA などの関与の末、TFIIH がリクルートされる。その後、ERCC1-XPF 複合体や XPG、XPA、RPA の働きによって損傷部位が切除され、PCNA と DNA ポリメラーゼによる損傷修復が行われる。

A



B

IDR sequences of TFIIH interaction partners

Interaction Partner	Residue Range	IDR Sequence	Residue Count
TFIIIE α	375 - 407	HKREEDDEEEDDEFEVADDPIVMVAGRPF [*] SYSE	407
XPC	121 - 153	DSNEEEEESENDWEEVEELSEPVLGDVRE [*] STAF	153
UVSSA	396 - 428	LGDAEEDDEDDEDFVEVPEKEGYEPHIPDHLRPE	428
P53	41 - 73	DDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPV	73
DP1	391 - 410	SYVGEDDEEDDDFNENDEDD	410

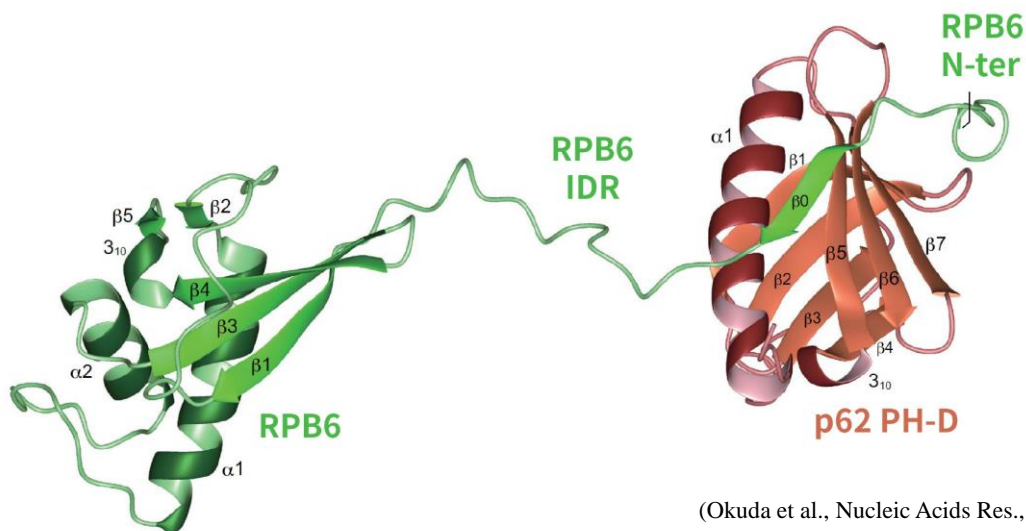
IDR sequence of RPB6

RPB6	1 - 33	MSDNEDNFDGDDFDDVEEDEGLDDL [*] ENAE [*] EEEGQ	33
------	--------	--	----

図 1-6 TFIIH-p62 PH-D の多様な相互作用因子とその機能

(A) TFIIH のコアサブユニット p62 の PH-D と相互作用する因子と、その相互作用の機能を示した。TFIIH-p62 PH-D はこれら相互作用因子の天然変性領域 (IDR) と相互作用している。(B) TFIIH-p62 PH-D の相互作用因子の IDR の配列を示した (上)。また、RPB6 の IDR の配列も示した (下)。酸性アミノ酸を赤色の文字で、芳香族アミノ酸を緑色の文字で表現している。

A



B

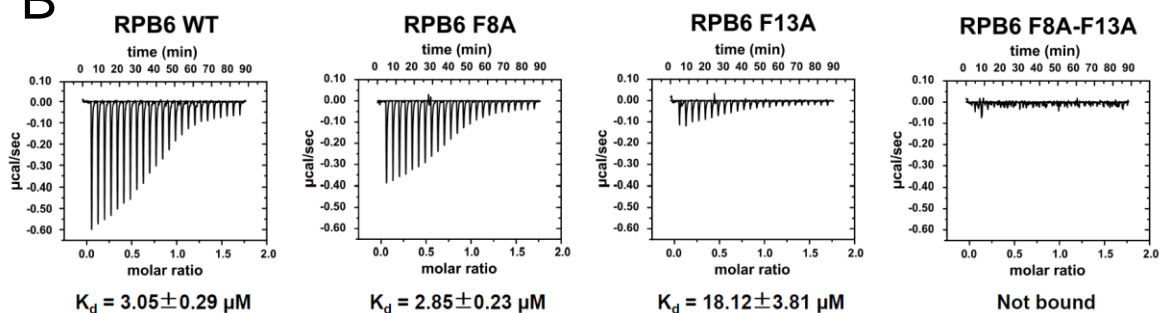


図 1-7 RPB6 と p62 PH-D の相互作用の NMR 解析と ITC 解析

(A) NMR を用いて解析された、RPB6 と p62 PH-D の相互作用の様子を示した。RPB6 の N 末端に存在する天然変性領域 (IDR) と p62 PH-D が相互作用している。(B) p62 PH-D との相互作用に重要であると予想されたアミノ酸に変異を入れた RPB6 と、p62 PH-D の K_d を ITC を用いて測定した結果を示した。p62 PH-D に対して野生型 (WT) RPB6 または変異型 (F8A、F13A、F8A-F13A) RPB6 を滴下しており、グラフ縦軸は反応熱量、横軸は p62 PH-D に対する RPB6 の物質量の比及び、滴下開始からの経過時間を表している。また、グラフ下には各 RPB6 と p62 PH-D の K_d を示した。

第 2 章 RPB6-TFIIH の相互作用と細胞増殖

2.1 緒言

RPB6 と TFIIH の相互作用の機能を明らかにするため、TFIIH と相互作用しない変異型 RPB6 を用いた遺伝学的解析を行うことにした。NMR と ITC を用いた RPB6 と p62 PH-D の相互作用の解析結果から、RPB6 の 13 番目と 8 番目の Phe が相互作用に重要であることが分かっている (図 1-7)。この結果を踏まえ、TFIIH と相互作用しない変異型 RPB6 として、13 番目の Phe を Ala に置換した F13A-RPB6、13 番目に加え 8 番目の Phe も Ala に置換した F8A/F13A-RPB6、2 番目から 20 番目までのアミノ酸を欠損させた Δ N20-RPB6 の 3 つの RPB6 を設計した (図 2-1A)。これら 3 つの変異型 RPB6 または、内在の RPB6 と同じアミノ酸配列を持つ WT-RPB6 を導入し、内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞を作製した。これらの表現型を比較することで、RPB6 と TFIIH の相互作用の機能を解明しようと試みた (図 2-1B)。具体的には、TFIIH または RPB6 がすでに関与していることが分かっている細胞増殖と転写、NER について比較解析を行った。本章では、作製した野生型 RPB6 発現細胞及び変異型 RPB6 発現細胞と、その増殖能に関する研究内容を説明する。

2.2 材料と方法

2.2.1 細胞の培養

HeLa 細胞 (invitrogen) 及び 293FT 細胞 (invitrogen) は、Fetal Bovine Serum (FBS) (BioWest) を 10% 添加した DMEM 培地を用いて培養した。この DMEM 培地は 5 x DMEM 100 ml、FBS 50 ml、7.5% 炭酸水素ナトリウム水溶液 25 ml、1N HCl 5 ml、超純水 380 ml を混合し調製した。また上記 5 x DMEM は、DMEM powder high glucose (Gibco) を超純水 2 L に溶かし、注射用ペニシリン G カリウム (Meiji Seika ファルマ) を 200 万単位、硫酸ストレプトマイシン注射用 (Meiji Seika ファルマ) を 2 g 加え調製した。なお、FBS は HeLa 細胞及び 293FT の培養用にロットチェックを行ったものを用いている。また 293FT 細胞は DMEM+10% FBS 培地に 400 µg/ml の G418 (ナカライテスク) を常に加えて培養していた。

2.2.2 内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターの作製

pRSI9-U6-(sh)-UbiC-TagRFP-2A-Puro (Collecta) からバーコード配列を取り除き、pRSI9 コントロールベクターを作製した。その後、内在の RPB6 に対するショートヘアピン RNA (shRNA) をコードする合成オリゴを、pRSI9 コントロールベクターに導入し、内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを作製した。内在の RPB6 に対する shRNA をコードする合成オリゴの配列は表 2-1 に示した。

2.2.3 野生型または変異型 RPB6 を発現させるレンチウイルスベクターの作製

2.2.2 で記述した shRNA の標的配列に変異を入れることで、shRNA への耐性を付加した野生型の RPB6 (WT) をコードした合成オリゴを pLenti6 (Thermo Fisher Scientific) に導入した。その後、インバース PCR を用いて、変異型 RPB6 (F13A、F8A/F13A、 Δ N20) を発現させるプラスミドを作製した。このプラスミドはプラスミドサイジン耐性遺伝子もコードしている。内在の RPB6 に対する shRNA への耐性を持つ、WT-RPB6 をコードする合成オリゴの配列は図 2-2 に示した。

2.2.4 RPB6 をノックダウンする、または発現させるレンチウイルスの調製

2.2.2 及び 2.2.3 で作製したレンチウイルスベクターと ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific) を 293FT 細胞に Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用

いてトランスフェクションした。トランスフェクション 72 時間後の培養上清を 3000 rpm で 15 分遠心し、その上清を Millex-HV Syringe Filter Unit 0.45 μm PVDF 33 mm (Merck) を用いてフィルトレーションした。

2.2.5 野生型または変異型 RPB6 の発現と内在の RPB6 のノックダウン

野生型 (WT) または変異型 RPB6 (F13A、F8A/F13A、 $\Delta\text{N}20$) を発現させるレンチウイルスを 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレン (Sigma-Aldrich) 存在下で HeLa 細胞に感染させた。その後、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のブラストサイジン (InvivoGen) を加えた培地を用いて、野生型または変異型 RPB6 を発現する細胞を選択的に培養した。1 週間後、内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリブレン存在下で感染させた。その後、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のピューロマイシン (invitrogen) を加えた培地を用いて、内在の RPB6 がノックダウンされた細胞を選択的に培養した。この後の項では、野生型または変異型 RPB6 を発現し、内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞を、『野生型及び変異型 RPB6 発現細胞』あるいは『WT-RPB6 発現細胞』、『F8A/F13A-RPB6 発現細胞』などと呼称する。

2.2.6 TotalRNA の抽出と定量 RT-PCR を用いた転写産物量の定量

1 x 10⁶ 細胞から Sepasol RNA I Super G (ナカライテスク) を用いて totalRNA を精製し、その濃度を Nano Drop One (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。One Step TB GreenTM PrimeScriptTM RT-PCR Kit (タカラバイオ) を用いて定量 RT-PCR 反応液を調製し、StepOnePlusTM Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して解析した。反応液は 20 ng/ μl totalRNA 2 μl 、2 x One Step TB Green RT-PCR Buffer 4 5 μl 、TaKaRa Ex Taq HS Mix 0.6 μl 、PrimeScript PLUS RTase Mix 0.2 μl 、10 μM Forward primer 0.4 μl 、10 μM Reverse primer 0.4 μl 、ROX Reference Dye 0.2 μl 、RNase Free dH₂O 1.2 μl の組成で調製した。また、定量 RT-PCR のプログラムは 42°C 5 分の逆転写を行うステップ、95°C 10 秒の耐熱酵素活性化ステップの後、95°C 5 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒の 3 ステップを 1 サイクルとして合計 40 サイクル行った。サンプルの定量は 72°C 30 秒のステップにおいて行った。

2.2.7 内在と外来の RPB6 の定量に用いたプライマー

内在の RPB6 のノックダウン効率と外来の RPB6 (野生型及び変異型 RPB6) の発現量を

調べるため、内在と外来の RPB6 を区別して認識するプライマー (RPB6_endo、RPB6_exo) と区別せず認識するプライマー (RPB6_total) を設計した (表 2-1)。外来の RPB6 (WT、F13A、F8A/F13A、 Δ N20) の塩基配列は内在の RPB6 に対する shRNA への耐性を持たせるために、翻訳されるアミノ酸が変化しない範囲で、shRNA の標的となる塩基配列に変異を入れてある。その領域を認識するプライマーを用いることで内在と外来の RPB6 を区別した。

2.2.8 内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞の生存率の測定

12 ウェルプレート (IWAKI) に 4×10^4 細胞の HeLa 細胞を播種し、 37°C で 24 時間培養した。その後、内在の RPB6 に対する shRNA を発現させるレンチウイルス $40 \mu\text{l}$ と、DMEM+10% FBS 培地 $460 \mu\text{l}$ を用いて培養上清を置換し、さらにポリブレンを終濃度 $8 \mu\text{g/ml}$ になるように加えた。 37°C で 12 時間培養した後、培養上清を新しい DMEM+10% FBS 培地 1 ml に交換した。レンチウイルスの感染から 48 時間後、12 ウェルプレートに接着している細胞の培養上清を捨て、 $500 \mu\text{l}$ の phosphate buffered-saline (PBS) を用いて 1 回洗浄した。その後、0.025% トリプシン溶液 $200 \mu\text{l}$ を添加し、 37°C で 1 分間反応させた。細胞が遊離したら、DMEM+10% FBS 培地 $800 \mu\text{l}$ を用いて細胞を懸濁し、 200 G で 5 分間遠心した。上清を捨てた後、DMEM+10% FBS 培地 $960 \mu\text{l}$ で再懸濁した。感染後 96 時間と 120 時間の細胞生存率をそれぞれ測定するため、細胞数を変え測定用の 96 ウェルプレート (IWAKI) に播種した。ウイルス感染後 96 時間用に $60 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を、120 時間用に $30 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を 96 ウェルプレートのウェルに加え、培養液が全量で $100 \mu\text{l}$ になるように DMEM+10% FBS 培地を加えた。感染後 96 時間または 120 時間後に、 $10 \mu\text{l}$ の生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク) を各ウェルに加え混合した。この生細胞数測定試薬 SF は生細胞内のミトコンドリア脱水素酵素の活性を利用し高水溶性ホルマザン色素を生成させ、その吸光度を測定することでサンプル中の生細胞数を推定する試薬である。 37°C で 1 時間、生細胞数測定試薬 SF を反応させ、GloMax®-Multi Detection System (Promega) を用いて波長 450 nm 、参照波長 600 nm で吸光度測定を行った。shRNA を発現しない pRSI9 コントロールウイルスを感染させた細胞の吸光度を基準に、内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞の生存率を算出した。この実験は 3 つのバイオロジカルレプリケートを用いて行った。

2.2.9 ウェスタンブロッティングを用いた RPB6 の発現量解析

2.2.5 の項で作製した WT-RPB6 発現細胞と F13A-RPB6 発現細胞及び、コントロール HeLa 細胞を 1×10^6 個分取し、500 mM NaCl と 1% Nonidet P-40 (ナカライテスク) を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.0 (High salt lysis buffer) 150 μ l を用いて溶解した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動には、4x サンプルバッファーと High salt lysis buffer を用いてタンパク質濃度を 1 mg/ml に調整し、98°C で 5 分間加熱した細胞溶解液を使用した。この 4x サンプルバッファーは、1 M のトリス塩酸緩衝液 pH 6.8 10 ml とラウリル硫酸ナトリウム (ナカライテスク) 3.2 g、2-メルカプトエタノール (ナカライテスク) 8 ml、グリセロール (ナカライテスク) 20 g、ブロモフェノールブルー (Sigma-Aldrich) 10 mg を脱イオン水で総液量が 40 ml になるように希釈し調製した。

各サンプルを 10 μ l ずつ、12.5%ポリアクリルアミドゲルの各ウェルにアプライし、Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) を用いて 1 枚当たり 30 mA で 1 時間 30 分程度、電気泳動した。12.5%ポリアクリルアミドゲルは Solution A 2.5 ml、Solution B 1.5 ml、脱イオン水 2 ml、10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム水溶液 (富士フイルム和光純薬) 40 μ l、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (ナカライテスク) 10 μ l からなるセパレートゲルと、Solution A 1 ml、Solution C 1.25 ml、脱イオン水 2.7 ml、10% ペルオキシ二硫酸アンモニウム水溶液 50 μ l、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン 7.5 μ l からなるスタッキングゲルで構成されている。Solution A はアクリルアミド (モノマー) (ナカライテスク) 146 g と N,N'-メチレンビスアクリルアミド (ナカライテスク) 4 g を総液量が 500 ml になるように脱イオンで溶解し調製した。また、Solution B は 0.4% のラウリル硫酸ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液 pH 8.8 であり、Solution C は 0.4% のラウリル硫酸ナトリウムを含むトリス塩酸緩衝液 pH 6.8 のことである。また、電気泳動に使用したバッファーは 11.52 g のグリシン (ナカライテスク) と 2.4 g のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、640 mg のラウリル硫酸ナトリウムを総液量が 800 ml になるように脱イオン水で溶解し調製した。

電気泳動後、ポリアクリルアミドゲル内のタンパク質を Immobilon-P PVDF Membrane (Merck) に Mini Trans-Blot® Cell を用いて 100 V で 1 時間転写した。また、メンブレンへの転写は Transfer Buffer (14.4 g のグリシンと 3 g のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、100 ml のメタノール、900 ml の脱イオン水を混合した溶液) 中に行った。タンパク質

が転写されたメンブレンに Blocking One (ナカライテスク) を室温で 1 時間反応させた。その後、1 次抗体希釈液 Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) で 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈した Anti-beta Actin 抗体 ab6276 (Abcam) 及び、Anti-RPB6 抗体 (筑波大 久武博士より分与) を室温で 1 時間反応させ、その後、1%のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク) を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) を用いて 3 回洗浄した。洗浄後、TBS-T で 3000 倍希釈した Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody #7076 (CellSignaling) を室温で 30 分間反応させ、その後、TBS-T を用いて 3 回洗浄した。洗浄後のメンブレンに Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を室温で 1 分間反応させ、メンブレンに転写された β -Actin 及び RPB6 を発光させた。暗室内でメンブレンを化学発光用フィルム Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) に接触させ、フィルムを露光させた。露光後、フィルムをハイレンドール現像液 (FUJIFILM) と 2.5% 酢酸 (固定液)、ハイレンフィックス定着液 (FUJIFILM) に 1 分ずつ順番に反応させた。

2.2.10 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞の増殖曲線と倍加時間の算出

野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を 1.25×10^5 細胞ずつ 6 cm ディッシュ (IWAKI) に播種し培養した。4 日後、細胞を 1 ml の PBS を用いて洗浄し、500 μl の 0.025% トリプシン溶液を加え 1 分間 37°C で反応させた。4.5 ml の DMEM+10% FBS 培地を用いて細胞を懸濁し、15 ml チューブに移した。200 G で 5 分間遠心した後、上清を捨て、細胞ペレットを 5 ml の DMEM+10% FBS 培地で再懸濁した。細胞の濃度を血球計算版を用いて測定し総細胞数を算出した。その後、各細胞を 1.25×10^5 細胞ずつ 6 cm ディッシュにそれぞれ播種し培養した。3 日後 (実験初日から 7 日後)、4 日後と同様に総細胞数を算出した。この実験は 3 つのバイオロジカルレプリケートを用いて行った。

2.3 結果

2.3.1 RPB6 は細胞の生存に重要である

内在の RPB6 をノックダウンし、野生型または変異型 RPB6 を導入した細胞を作製するために、まず内在の RPB6 をノックダウンすることにした。本研究では内在の RPB6 に対する shRNA を 3 種類設計し、その shRNA を発現させるレンチウイルスをそれぞれ作製した。これらレンチウイルスを HeLa 細胞に感染させ、内在の RPB6 のノックダウン効率を定量 RT-PCR を用いて調べたところ、どのレンチウイルスも 9 割以上のノックダウン効率を示した (図 2-3A)。その中で最もノックダウン効率の高かった sh#2 を発現させるレンチウイルスを HeLa 細胞に感染させたところ、コントロールウイルス感染細胞に比べ、感染後 96 時間では 40% 程度、120 時間では 97% 程度の細胞が死滅してしまった (図 2-3B)。この結果は RPB6 が細胞の生存に重要であることを示すとともに、目的の細胞を樹立するためにはノックダウンの前に、野生型または変異型 RPB6 を導入する必要があることを示唆している。

2.3.2 野生型 RPB6 は細胞増殖に関して内在の RPB6 を代替している

HeLa 細胞の内在の RPB6 をノックダウンすると細胞が死滅してしまうので、ノックダウンの前に野生型または変異型 RPB6 を導入することにした。その予備実験として、内在の RPB6 のノックダウンによる細胞死が、WT-RPB6 を導入することでレスキューするのか調べた。まず、HeLa 細胞に WT-RPB6 を発現させるレンチウイルス、またはコントロールウイルスを感染させ、ブラストサイジンを用いてレンチウイルス感染細胞を選択的に培養した。その後、内在の RPB6 に対する shRNA を発現させるレンチウイルス、または pRSI9 コントロールウイルスをそれぞれの細胞に感染させた。その結果、WT-RPB6 を発現しない細胞では、内在の RPB6 のノックダウンによって大半の細胞が死滅した。しかし、WT-RPB6 発現細胞は全く死滅しなかった (図 2-3C)。この結果は、内在の RPB6 に対する shRNA を発現させるレンチウイルスの感染後に起こる細胞死が、RPB6 のノックダウンによるものであることを裏付けている。また、導入した WT-RPB6 が細胞増殖において内在の RPB6 を代替できることも示している。

2.3.3 内在の RPB6 を野生型または変異型 RPB6 で『置換』した細胞を樹立できた

2.3.2 で、内在の RPB6 を WT-RPB6 で置換できることが分かったので、野生型または変異型の RPB6 を導入し、内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞を、RPB6-TFIIH の相互作用の機能的な意義を明らかにするために作製した。内在の RPB6 と外来の RPB6 を区別できるプライマーセットを用いて定量 RT-PCR を行ったところ、これらの細胞では内在の RPB6 の発現量がコントロール HeLa 細胞の 10 分の 1 以下に低下していることが分かった。また、外来の野生型及び変異型 RPB6 の発現量は約 2 倍の範囲内に収まっているが、コントロール HeLa 細胞における内在の RPB6 よりも 5 倍以上多く発現していた (図 2-4A)。また、ウェスタンブロッティングを用いてコントロール HeLa 細胞及び WT-RPB6 発現細胞、F13A-RPB6 発現細胞における RPB6 の発現量を調べた結果、WT-RPB6 発現細胞と F13A-RPB6 発現細胞ではコントロール HeLa 細胞に比べ RPB6 の発現量が増加していた (図 2-4B)。この結果は、定量 RT-PCR を用いた解析 (図 2-4A) と、おおよそ同様の結果であった。これらは、内在の RPB6 と外来の RPB6 の発現量がなるべく揃うよう条件検討して得られたベストの結果であり、内在の RPB6 を外来の RPB6 でほぼ完全に『置換』することができた。しかし、外来の RPB6 の発現量が過剰である点には留意が必要である。ともあれ、これら野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を以降の遺伝学的解析に用いた。

2.3.4 RPB6-TFIIH の相互作用は細胞の増殖において重要である

次に、RPB6-TFIIH の相互作用が細胞の増殖に関与するのか調べるため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞の倍化時間を調べた。その結果、WT-RPB6 発現細胞と F13A-RPB6 発現細胞の倍化時間は 24 時間程度 (WT 23.5 時間、F13A 23.7 時間) であり、コントロール HeLa 細胞の倍化時間とほぼ一致していた。しかし、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞の増殖速度は明らかに遅く、倍化時間は 30 時間を超えていた (F8A/F13A 30.4 時間、 Δ N20 33.1 時間) (図 2-5)。この結果を、ITC により得られた相互作用のデータ (図 1-7) と比較すると、WT-RPB6 と比べて親和性は低下しているものの p62 PH-D 結合能を保持している F13A-RPB6 を発現する細胞では増殖遅延が観察されなかったのに対して、p62 PH-D と全く結合しない F8A/F13A-RPB6 または Δ N20-RPB6 を発現する細胞では増殖遅延が観察された。以上から次の 3 つの結論を導くことができる。

(i) RPB6 の天然変性領域以外の領域 (コアドメイン) は細胞の生存に必須である。RPB6 のノックダウンによる細胞死が Δ N20-RPB6 の発現によりレスキューされたことから、RPB6 のコアドメインさえあれば細胞は生存可能であると考えられる。また RPB6 は RNAP のアッセンブリに重要と言われているが [6]、進化的に保存された RPB6 のコアドメインが RNAP のアッセンブリを担っていると推測される。

(ii) RPB6 の天然変性領域は細胞の生存に必須でないが、細胞の増殖には関与している。 Δ N20-RPB6 発現細胞は生育こそしたが、その増殖速度は遅延していた。つまり、野生型細胞で見られた増殖速度を達成するには RPB6 の天然変性領域が必要であると考えられる。

(iii) RPB6-TFIIH の相互作用は細胞増殖に関与している。野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞の増殖速度は、p62 PH-D との結合親和性と相関していた。この結果は RPB6-TFIIH の相互作用が細胞増殖に関与していることを示唆している。

補足すると、研究開始当初は RPB6 の F8 の重要性に気付かず、他の p62 PH-D 相互作用因子の配列相同性 (図 1-6) に基づき、F13 のみに注目して変異体の解析を行っていた。しかし、F13A-RPB6 発現細胞と WT-RPB6 発現細胞の間で表現型に差異をほとんど見出せなかったことから、ITC のデータ (図 1-7) に立ち返り、F13A-RPB6 変異体に残存する p62 PH-D 結合能が影響して表現型の変化を認めづらいのではないかと推察した。F13A 変異体に p62 PH-D 結合能が残存している理由は、近傍に存在する F8 が F13 の代替として機能しているからだと推測し、F8A/F13A 二重変異体を作製したところ、同変異体は p62 PH-D 結合能を完全に失っていた (図 1-7)。さらに細胞レベルでは、F8A/F13A-RPB6 発現細胞は Δ N20-RPB6 発現細胞に匹敵する表現型の変化を示した (図 2-4 など)。以上のようなフィードバックを経て、本研究ではこれら 3 つの変異体が用いられることとなった。

2.4 本章のまとめ

RPB6-TFIIH 相互作用の機能的な意義を明らかにするため、TFIIH と相互作用しない変異型 RPB6 を用いた遺伝学的解析を行うことにした。具体的には、野生型 (WT) または変異型 (F13A、F8A/F13A、 Δ N20) RPB6 を導入し、内在の RPB6 をノックダウンした HeLa 細胞の表現型を比較解析することにした。まず、これらの細胞の増殖速度を比較したところ、WT-RPB6 発現細胞と F13A-RPB6 発現細胞の倍化時間は 24 時間程度であった。一方、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞の倍化時間は 30 時間を超えており、細胞増殖速度の鈍化が見られた。この結果は、RPB6-TFIIH の相互作用が細胞増殖に重要であることを示唆している。しかし、RPB6-TFIIH の相互作用がどのようにして細胞増殖に関与するのか分かっていない。以降の項では、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞の表現型の比較解析をさらに行い、RPB6-TFIIH の相互作用の機能についての理解を深めていく。

2.5 図表

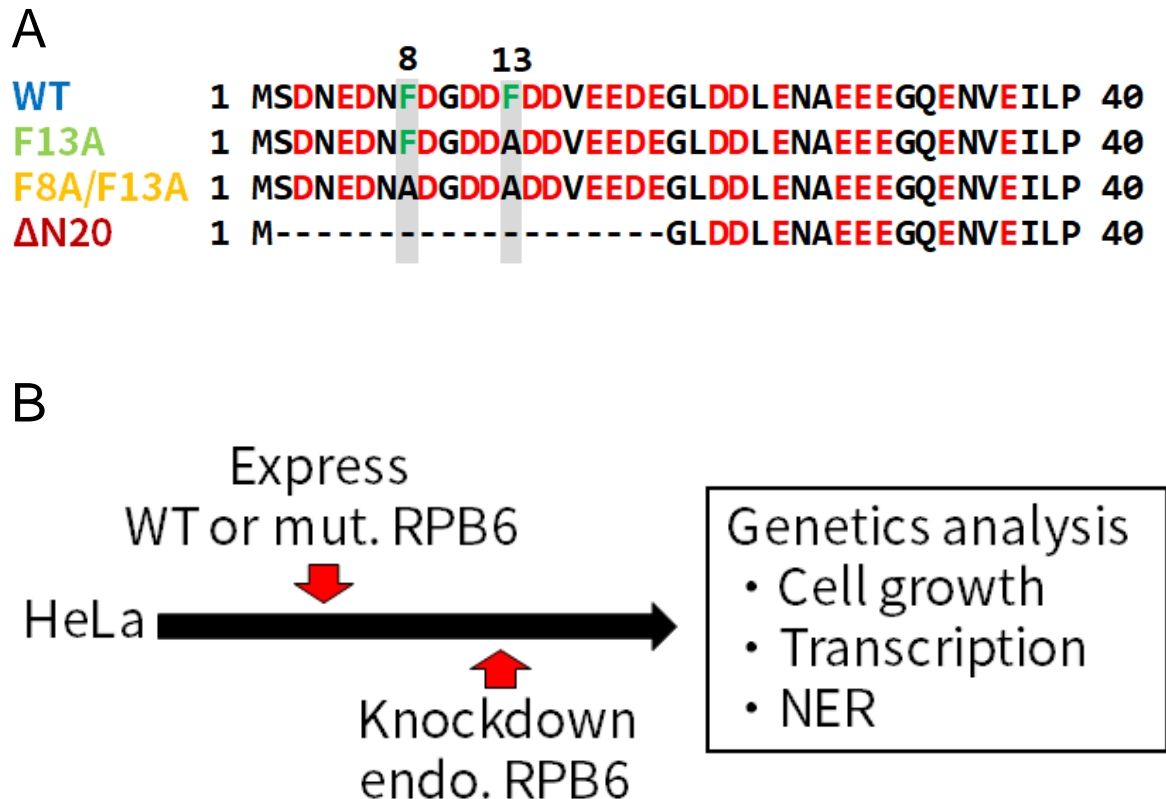


図 2-1 遺伝学的解析に用いた野生型及び変異型 RPB6 の配列と遺伝学的解析の流れ

(A) 遺伝学的解析に用いた野生型及び変異型 RPB6 のアミノ酸配列を示した。WT は内在の RPB6 と同じ配列を持つコントロール用の RPB6 であり、残りの 3 つの RPB6 (F13A、F8A/F13A、ΔN20) は TFIIH-p62 PH-D との相互作用能を失うように相互作用に重要なアミノ酸を変異または欠損させている。酸性アミノ酸を赤色の文字で、芳香族アミノ酸を緑色の文字で表現した。(B) 内在の RPB6 を野生型または変異型 RPB6 を用いて、機能的に置換した細胞の作製から、その後の遺伝学的解析までの流れを示した。HeLa 細胞に野生型または変異型 RPB6 を発現させ、その後内在の RPB6 をノックダウンした。これらの細胞の表現型を細胞増殖、転写反応、NER の 3 つの観点で比較した。

A

RPB6 に対する shRNA を発現するプラスミドの作製に使用した合成オリゴ	
RPB6_sh#1s	5'-ACCGGGAAGCGAATCATCACACTATAGTTAATATTCATAGCTATGGTGTGGTGATTCGCTTCTTT-3'
RPB6_sh#1as	5'-GAAAAAAGAAGCGAATCACCACACCATAGCTATGAATATTAAGTATAGTGTGATGATTCGCTTCC-3'
RPB6_sh#2s	5'-ACCGGGATGATTTGGAGAATGCTGAAGTTAATATTCATAGCTTCGGCATTCTCCAAGTCATCTTT-3'
RPB6_sh#2as	5'-GAAAAAAGATGACTTGGAGAATGCCGAAGCTATGAATATTAAGTTCAGCATTCTCCAAATCATCC-3'
RPB6_sh#3s	5'-ACCGGGAAGGAACTTAAGGCCTGAAAGTTAATATTCATAGCTTTCGGGCCTTGAGTTCCTTCTTT-3'
RPB6_sh#3as	5'-GAAAAAAGAAGGAACTCAAGGCCCGAAAGCTATGAATATTAAGTTCAGGCCTTAAGTTCCTTCC-3'

B

RPB6 の発現量の定量に使用した合成オリゴ	
RPB6_total_Fwd	5'-ATGACCAAGTACGAGCGAGC-3'
RPB6_total_Rev	5'-CTCCCATCTGGCAGGTAACG-3'
RPB6_endo_Fwd	5'-GCCAACCAGAAGCGAATCAC-3'
RPB6_endo_Rev	5'-CTTTCGGGCCTTGAGTTCCT-3'
RPB6_exo_Fwd	5'-CCAAAAACGGATTACAACCCCC-3'
RPB6_exo_Rev	5'-TCTTCCGTGCTTTCAGCTCT-3'

表 2-1 プラスミドの作製と RPB6 の発現量の定量に使用した合成オリゴの配列

(A) 内在の RPB6 に対する shRNA を発現するプラスミドの調製では、その shRNA をコードする相補的な 2 本の合成オリゴ (sh#1s と sh#1as、sh#2s と sh#2as、sh#3s と sh#3as) をアニリングさせ、pRSI9 コントロールベクターに挿入した。(B) 野生型または変異型 RPB6 を発現させ、内在の RPB6 をノックダウンした細胞での内在及び外来 RPB6 の定量に使用した合成オリゴの配列を示した。内在と外来の RPB6 の区別には、shRNA への耐性獲得のために外来 RPB6 の塩基配列に入れた変異を利用した。

```

Endo. RPB6 1 ATGTCAGACAACGAGGACAATTTTGTGGCGACGACTTTGATGATGTGGAGGAGGATGAA 60
                |||
WT-RPB6 1 ATGTCAGACAACGAGGACAATTTTGTGGCGACGACTTTGATGATGTGGAGGAGGATGAA 60

Endo. RPB6 61 GGGCTAGATGACTTGGAGAATGCCGAAAGAGGAAGGCCAGGAGAATGTCGAGATCCTCCCC 120
                ||| |#| ##| #| #| #| #| |||
WT-RPB6 61 GGGCTAGACGATCTTAAAAACGCTGAGGAGGAAGGCCAGGAGAATGTCGAGATCCTCCCC 120

Endo. RPB6 121 TCTGGGGAGCGACCGCAGGCCAACCAGAGCGAATCACCACACCATACATGACCAAGTAC 180
                ||| ||| |#| #| #| #| #| #| |||
WT-RPB6 121 TCTGGGGAGCGACCGCAGGCCAACCAGAGCGAATCACCACACCATACATGACCAAGTAC 180

Endo. RPB6 181 GAGCGAGCCCGCGTGTGGGCACCCGAGCGCTCCAGATTGCGATGTGTGCCCTGTGATG 240
                |||
WT-RPB6 181 GAGCGAGCCCGCGTGTGGGCACCCGAGCGCTCCAGATTGCGATGTGTGCCCTGTGATG 240

Endo. RPB6 241 GTGGAGCTGGAGGGGGAGACAGATCCTCTGCTCATTGCCATGAAGGAACTCAAGGCCCGA 300
                ||| ||| |#| #| #| #| #| #|
WT-RPB6 241 GTGGAGCTGGAGGGGGAGACAGATCCTCTGCTCATTGCCATGAAAGAGCTGAAAGCACGG 300

Endo. RPB6 301 AAGATCCCCATCATCATTGCGCCGTACCTGCCAGATGGGAGCTATGAAGACTGGGGGGTG 360
                |||
WT-RPB6 301 AAGATCCCCATCATCATTGCGCCGTACCTGCCAGATGGGAGCTATGAAGACTGGGGGGTG 360

Endo. RPB6 361 GACGAGCTCATCATCACCGACTGA 384
                |||
WT-RPB6 361 GACGAGCTCATCATCACCGACTGA 384

```

※ Target sequence of shRNA

図 2-2 内在の RPB6 に対する shRNA への耐性を持つ WT-RPB6 の配列

内在の RPB6 (Endo. RPB6) のアミノ酸配列と、本研究で HeLa 細胞に導入した WT-RPB6 の塩基配列を示した。RPB6 の発現とノックダウンを同時に行うため、WT-RPB6 は内在の RPB6 に対する shRNA への耐性を獲得している必要があった。赤色の文字であらわした塩基配列は内在の RPB6 に対する shRNA の標的配列を示しており、WT-RPB6 では耐性を獲得するように翻訳後のアミノ酸が変化しないように塩基配列に変異を入れてある。#は内在の RPB6 と WT-RPB6 で異なっている塩基を表している。

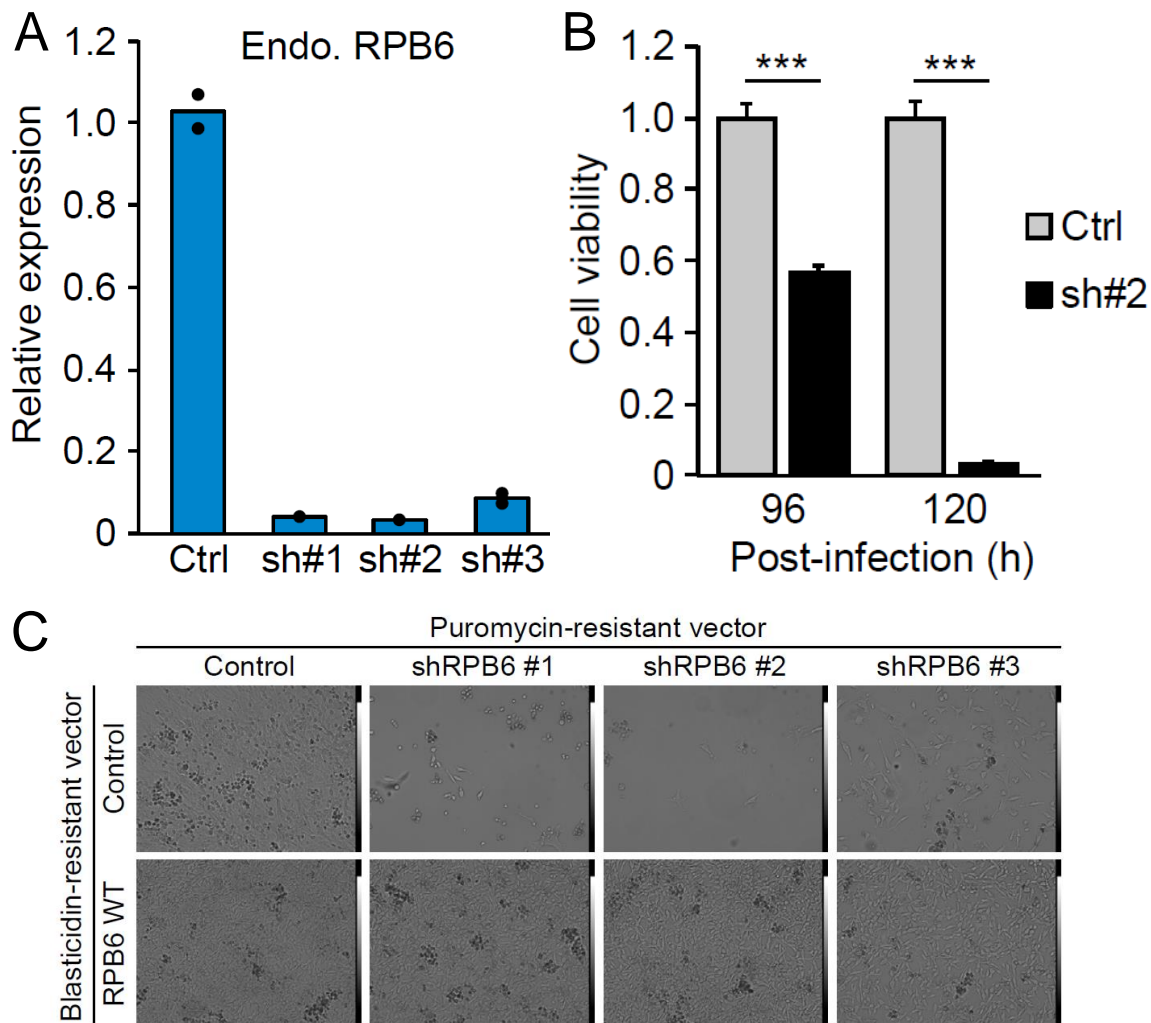


図 2-3 内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを用いたノックダウン
 (A) 内在の RPB6 に対する shRNA を発現するレンチウイルス、または pRSI9 コントロールウイルスを HeLa 細胞に 96 時間感染させ、内在の RPB6 の発現量を定量 RT-PCR を用いて調べた。グラフには平均値と個々のデータポイント (n=2) を示した。(B) sh#2 を発現するレンチウイルスを 96 時間、または 120 時間感染させた HeLa 細胞の生存率を示した。pRSI9 コントロールウイルスを感染させた細胞の数を用いて生存率を算出している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、***は $p < 0.001$ (two-tailed Student's t-test) を表している。(C) コントロールウイルスまたは WT-RPB6 を発現させるレンチウイルスを感染させた HeLa 細胞に、内在の RPB6 をノックダウンするレンチウイルスまたは pRSI9 コントロールウイルスを 7 日間感染させ、細胞の様子を位相差顕微鏡を用いて撮影した。

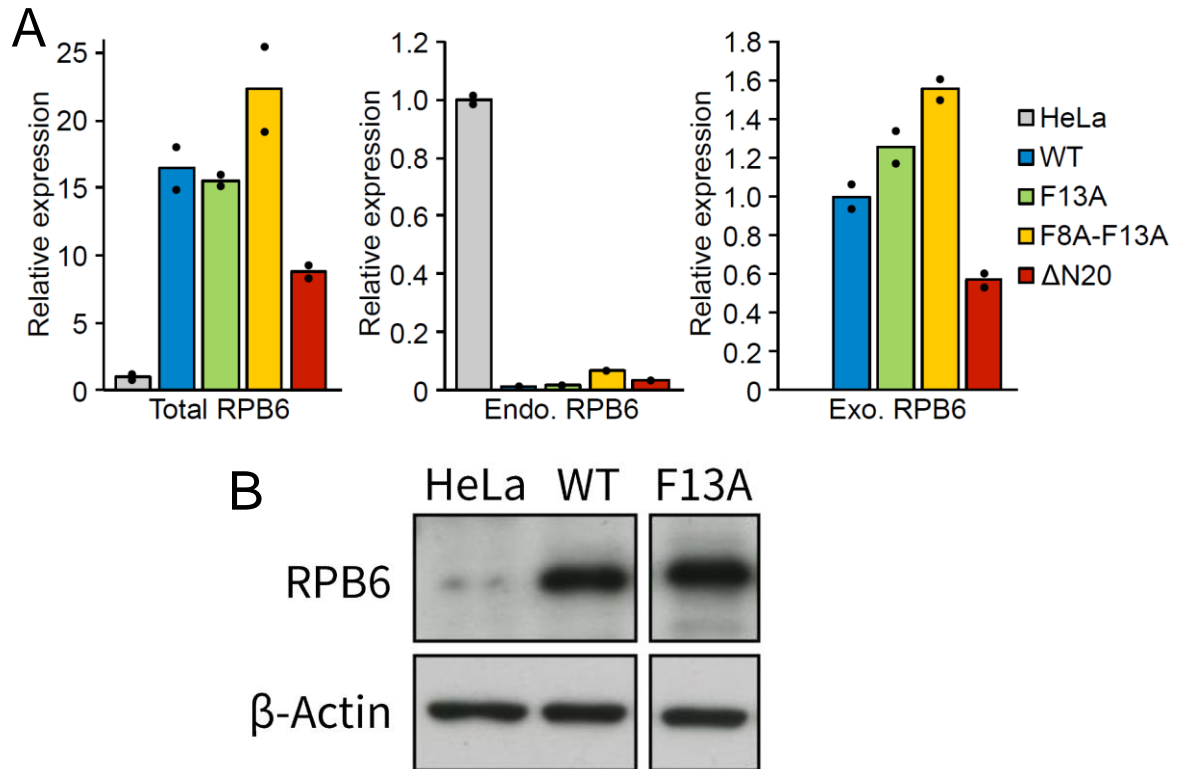
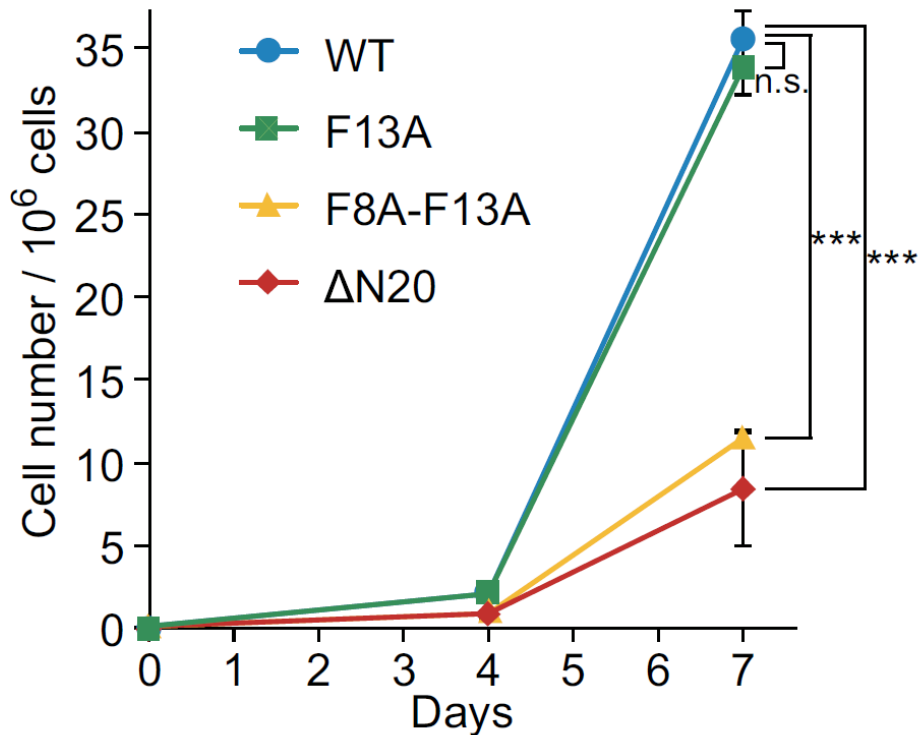


図 2-4 野生型または変異型 RPB6 を発現し、内在の RPB6 をノックダウンした細胞

(A) 野生型または変異型 RPB6 を発現し、内在の RPB6 をノックダウンした細胞と野生型の HeLa 細胞における RPB6 の定量 RT-PCR 解析。解析には内在の RPB6 と外来の RPB6 を区別しないプライマー (Total) と、内在の RPB6 (Endo.) と外来の RPB6 (Exo.) をそれぞれ区別できるプライマーの 3 種類を使用した。グラフには平均値と個々のデータポイント (n=2) を示した。(B) コントロール HeLa 細胞と WT-RPB6 発現細胞、F13A-RPB6 発現細胞における RPB6 と β-Actin の発現量をウェスタンブロッティングを用いて解析した。各サンプルにおける RPB6 と β-Actin のバンドは、それぞれ同一のポリアクリルアミドゲルで泳動されたサンプルであり、かつ一枚の画像の一部を切り抜いたものである。



	WT	F13A	F8A-F13A	ΔN20
Doubling time (h)	23.5	23.7	30.4	33.1

図 2-5 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞の増殖曲線

野生型または変異型 RPB6 を発現する細胞の細胞増殖曲線。それぞれ同じ細胞数から培養を開始し、培養 4 日目と 7 日目に細胞数を測定した。増殖曲線から算出された倍加時間を増殖曲線の下に示した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、***は p<0.001 (two-tailed Student's t-test) を、n.s.は有意差が存在しなかったことを表している。

第3章 RPB6-TFIIHの相互作用と転写反応

3.1 緒言

RPB6は細菌のRNAPの ω サブユニットのオーソログであり、真核生物の全RNAPに共通して存在する [1]。つまり、RPB6はRNAPがRNAPたる本質的な機能に関与していると考えられる。また、RPB6の天然変性領域は細菌には存在せず、真核生物にのみ存在している (図 1-3)。この天然変性領域を介したRPB6とTFIIHの相互作用は、細菌にはない真核生物特有の現象に関与していると考えられる。

RNAPの本質的な機能はもちろん転写反応である。それゆえ RPB6の天然変性領域を介したRNAPとTFIIHの相互作用は、RNAPIとRNAPII、RNAPIIIのいずれかの転写反応、または全RNAPの転写反応に関与している可能性がある。そこで本章では、野生型RPB6発現細胞と変異型RPB6発現細胞における各RNAPの転写産物量を比較し、RPB6-TFIIHの相互作用が転写反応に関与しているのか調べた。

3.2 材料と方法

3.2.1 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞における転写産物量の定量

野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における転写産物量の定量は 2.2.5 と概ね同じプロトコルで実施したが、一部変更点がある。変異型 RPB6 (F13A-RPB6、F8A/F13A-RPB6、 Δ N20-RPB6) 発現細胞ではコントロール細胞である WT-RPB6 発現細胞に比べ、転写産物量が全遺伝子的に低下しており、一般的に定量 RT-PCR で用いられている鋳型量によるサンプルのノーマライズや、内在性コントロールを用いたノーマライズを行うことが出来ない。そこで本実験では同じ数の細胞から totalRNA を抽出し、同じ液量の totalRNA 溶液を定量 RT-PCR の鋳型として使用した。つまり、全サンプル同じ細胞数由来の totalRNA を鋳型として使用している。また、本研究では成熟 rRNA の定量も行っているが、成熟 rRNA は他の解析対象遺伝子に比べ発現量が非常に多いため totalRNA 溶液を 100 倍希釈して使用している。この実験は 3 つのバイオロジカルレプリケートを用いて行った。

3.2.2 RNAPI と RNAPII、RNAPIII が転写を担う遺伝子に対するプライマーの設計

【RNAPI】

RNAPI は rRNA の転写を行っており、18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA を転写している。これら rRNA は共通の前駆体である 47S rRNA から作られる。本研究ではイントロンを認識するフォワードプライマーと、エキソンを認識するリバースプライマーを組み合わせ前駆体 rRNA (ETS-18S、ITS-5.8S、ITS-28S) の定量を行った。また、成熟 rRNA の定量には各 rRNA のエキソン内を認識するプライマーセットを用いた (表 3-1)。

【RNAPII】

RNAPII が転写を担う遺伝子の定量には *GAPDH*、*ACTB*、*CDKN1A*、*FOS* の 4 遺伝子に対するプライマーを使用した。前駆体 mRNA の定量には各遺伝子のイントロン内を認識するプライマーセット (pre_*GAPDH*、pre_*ACTB*、pre_*CDKN1A*、pre_*FOS*) を用い、成熟 mRNA の定量にはエキソン内を認識するプライマーセット (mat_*GAPDH*、mat_*ACTB*、mat_*CDKN1A*、mat_*FOS*) を用いた (表 3-1)。

【RNAPIII】

RNAPIII は tRNA といくつかの低分子 RNA の転写している。本研究では 3 つの tRNA (Tyr、His、Lys) と 3 つの低分子 RNA (5S、U6、7SK) の定量を行った。tRNA の遺伝子は、同一のアミノ酸に対する tRNA であっても、認識するコドンによって配列が異なる。本研究では Tyr (GUA)、His (GUG)、Lys (UUU) に対するプライマーセットを使用した (表 3-1)。

3.2.3 RNA-seq を用いた mRNA の網羅的発現量解析

totalRNA を Sepasol RNA I Super G を用いて抽出し、さらに RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。RNA-seq のライブラリーは SureSelect Strand Specific RNA Library Preparation Kit (Agilent) を用いて調製し、NextSeq 500/550 HighOutput Kit v2.5 (Illumina) を用い、NextSeq 500 (Illumina) で 75 サイクルシーケンス (シングルリード) 解析を行った。CLC Genomics Workbench version 11.0 (Qiagen) を用いて、RNA-seq によって得られたデータ (>10,000,000 リード/サンプル) をリファレンスゲノム配列 GRCh38 にマッピングした。Transcripts per million を用い、発現量の倍率変化が 2 以上かつ False Discovery Rate (FDR) q 値が 0.05 以下の遺伝子を発現変動遺伝子として同定した。同定した発現変動遺伝子の Gene Set Enrichment Analysis には Functional Annotation Tool DAVID を使用した。この実験は 3 つのバイオリジカルレプリケートを用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI の転写反応に重要である

まず、RPB6-TFIIH の相互作用が RNAPI の転写反応に関与しているのか調べるため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における RNAPI が転写を担う遺伝子の発現量を比較した。RNAPI は rRNA の転写を担っており、18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA を転写している。これら rRNA は共通の前駆体である 47S rRNA から作られ、本研究では成熟 rRNA (18S、5.8S、28S) に加え、前駆体 rRNA (ETS-18S、ITS-5.8S、ITS-18S) の定量も行った。前駆体 RNA は半減期が短く、より転写量を反映するため定量した。その結果、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では、転写産物量が WT-RPB6 発現細胞に比べてどの遺伝子においてもほぼ一様に減少していた (図 3-1)。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では、RNAPI の転写反応が機能欠損しており、これは RPB6-TFIIH の相互作用が RNAPI の転写反応に関与していることを示唆している。

3.3.2 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPII の転写反応に重要である

次に、RPB6-TFIIH の相互作用が RNAPII の転写反応に関与しているのか調べるため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における RNAPII が転写を担う遺伝子の発現量を比較した。RNAPII は mRNA の転写を担っており、担当している遺伝子の数は膨大である。そのため、すべての遺伝子を定量 RT-PCR を用いて解析するのは不可能であり、本研究では、よく定量 RT-PCR で使用されている 4 つの遺伝子 (*GAPDH*、*ACTB*、*CDKN1A*、*FOS*) について比較定量を行った。本研究では半減期が短く、より転写量を反映する前駆体 mRNA (pre) と、成熟 mRNA (mat) をそれぞれ区別して定量した。その結果、変異型 RPB6 発現細胞における *GAPDH* の発現量は、WT-RPB6 発現細胞に比べ、わずかに減少していることが分かった。また *ACTB* の発現量は、WT-RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞の間でわずかに変化していた。さらに *CDKN1A* と *FOS* の発現量は、変異型 RPB6 発現細胞で大きく減少していることも分かった (図 3-2A)。これらの結果から、変異型 RPB6 発現細胞における RNAPII の転写産物量は WT-RPB6 発現細胞と比べ変化しているが、その程度や増減は遺伝子ごとに異なっていることが予想された。

そこで次に、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における RNAPII の転写産

物量を RNA-seq を用いてゲノムワイドに比較した。WT-RPB6 発現細胞に比べ発現量の倍率変化が 2 以上かつ、FDR q 値が 0.05 以下であった遺伝子の数を、発現量の増減ごとに分け、整理したベン図を図 3-2B に示した。ベン図を見ると、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では、F13A-RPB6 発現細胞に比べ 4 倍以上の数の遺伝子の発現量が増加し、3 倍以上の数の遺伝子の発現量が減少していることが分かる。この結果は、野生型及び変異型 RPB6 と TFIIH の結合強度と関連しており、RPB6-TFIIH の相互作用が 1500 個以上の遺伝子における RNAPII の転写反応に重要であることを示唆している。

次に、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞で共通して発現量が増加した遺伝子と減少した遺伝子に、それぞれ共通した機能的特徴が存在するのか調べるため Gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。その結果、共通して発現量が増加した遺伝子には細胞接着に関与する遺伝子が多く存在することが分かった。また、共通して減少した遺伝子には目立った共通項は見られなかった (図 3-3)。

3.3.3 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPIII の転写反応に重要である

最後に、RPB6-TFIIH の相互作用が RNAPIII の転写反応に関与しているのか調べるため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における RNAPIII が転写を担う遺伝子の発現量を比較した。RNAPIII は tRNA と低分子 RNA の転写を担っており、本研究では 3 つの tRNA (Tyr, His, Lys) と 3 つの低分子 RNA (5S, U6, 7SK) の転写産物量を調べた。その結果、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では、WT-RPB6 発現細胞に比べて転写産物量がどの遺伝子においても減少していた (図 3-4)。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では RNAPIII の転写反応が機能欠損しており、これは RPB6-TFIIH の相互作用が RNAPIII の転写反応に重要であることを示している。

3.4 本章のまとめ

本章では、RPB6-TFIIH の相互作用が、RNAP の転写反応に関与しているのか調べるため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における、RNAPI と RNAPII、RNAPIII の転写産物量をそれぞれ定量し比較した。その結果、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では RNAPI 及び RNAPIII の転写産物量が 20% から 50% 低下していることが分かった。さらに、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では、1500 個を超える RNAPII が転写を担う遺伝子の発現量に変化していた。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞では全 RNAP の転写反応に異常が起こっており、この結果は RPB6-TFIIH の相互作用が全 RNAP の転写反応において重要であることを示唆している。

3.5 図表

RNAPI 転写産物用 qRT-PCR プライマー (Fwd / Rev)		
ETS-18S	5'-TCGCCGCGCTCTACCTTA-3'	5'-CTGTACCGGCCGTGCGTA-3'
ITS1-5.8S	5'-CTCGCCAAATCGACCTCGT-3'	5'-AAGTGTCGATGATCAATGTGTC-3'
ITS2-28S	5'-GCGATTCCGTCCTCCGT-3'	5'-CTGGTTAGTTTCTTCTCCTCCG-3'
5.8S_rRNA	5'-ACTCTTAGCGGTGGATCACTCG-3'	5'-CGAAGTGTCGATGATCAATGTG-3'
18S_rRNA	5'-ACGACCCATTCTGAACGTCTG-3'	5'-TCTCCGGAATCGAACCT-3'
28S_rRNA	5'-GCCGAAACGATCTCAACCTA-3'	5'-CCTTTTCTGGGGTCTGATGA-3'
RNAPII 転写産物用 qRT-PCR プライマー (Fwd / Rev)		
pre_GAPDH	5'-AGAGCTCAAGGTCAGCGCTC-3'	5'-CTAGGGGAAGGAGGCTCC-3'
pre_ACTB	5'-AATCTGGCACCACACCTTCTACA-3'	5'-GGCAGAAGAGAGAACCAGTGAGA-3'
pre_p21	5'-TGCCGAAGTCAGTTCCTTGT-3'	5'-TCTCACCTCCTCTGAGTGCC-3'
pre_c-fos	5'-AACTTCATTCCCACGGTCACTGC-3'	5'-AGTGGCTTCATCCTCTGTACTG-3'
mat_GAPDH	5'-CTGGCGTCTTACCACCATGG-3'	5'-CATCACGCCACAGTTCCCGG-3'
mat_ACTB	5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3'	5'-CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3'
mat_p21	5'-AAGACCATGTGGACCTGTAC-3'	5'-AGACTAAGGCAGAAGATGTAG-3'
mat_c-fos	5'-CACTCCAAGCGGAGACAGAC-3'	5'-GAGCTGCCAGGATGAACTCT-3'
RNAPIII 転写産物用 qRT-PCR プライマー (Fwd / Rev)		
tRNA-Tyr-GTA	5'-TGTAGATCCTTAGGTCGCTGG-3'	5'-TCCTTCGAGCCGGAATCG-3'
tRNA-His-GTG	5'-TTGTGGCCGCAGCAACCT-3'	5'-TGCCGTGACTCGGATTCG-3'
tRNA-Lys-UUU	5'-GTCGGTAGAGCATCAGACTT-3'	5'-CCTGGACCTCAGATTAATA-3'
7SK	5'-ATTGATCGCCAGGGTTGATTC-3'	5'-AATGGACCTTGAGAGCTTGTGTTG-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
5S_rRNA	5'-GTCTACGGCCATACCACCCTG-3'	5'-GCCTACAGCACCCGGTATTCC-3'

表 3-1 RNAPI と RNAPII、RNAPIII が転写する遺伝子に対するプライマー

各 RNAP の転写産物量の解析に使用した定量 RT-PCR 用のプライマー。左側にフォワードプライマーの配列を、右側にリバースプライマーの配列を示した。RNAPI 転写産物用の定量 RT-PCR プライマーには、前駆体 rRNA 用の 3 つのプライマー (ETS-18S、ITS1-5.8S、ITS2-28S) とエキソン内しか増幅しない成熟 rRNA 用の 3 つのプライマー (5.8S_rRNA、18S_rRNA、28S_rRNA) を用いた。RNAPII 転写産物用の定量 RT-PCR プライマーには、前駆体 mRNA の用のプライマー (pre) と成熟 mRNA 用のプライマー (mat) を用いた。

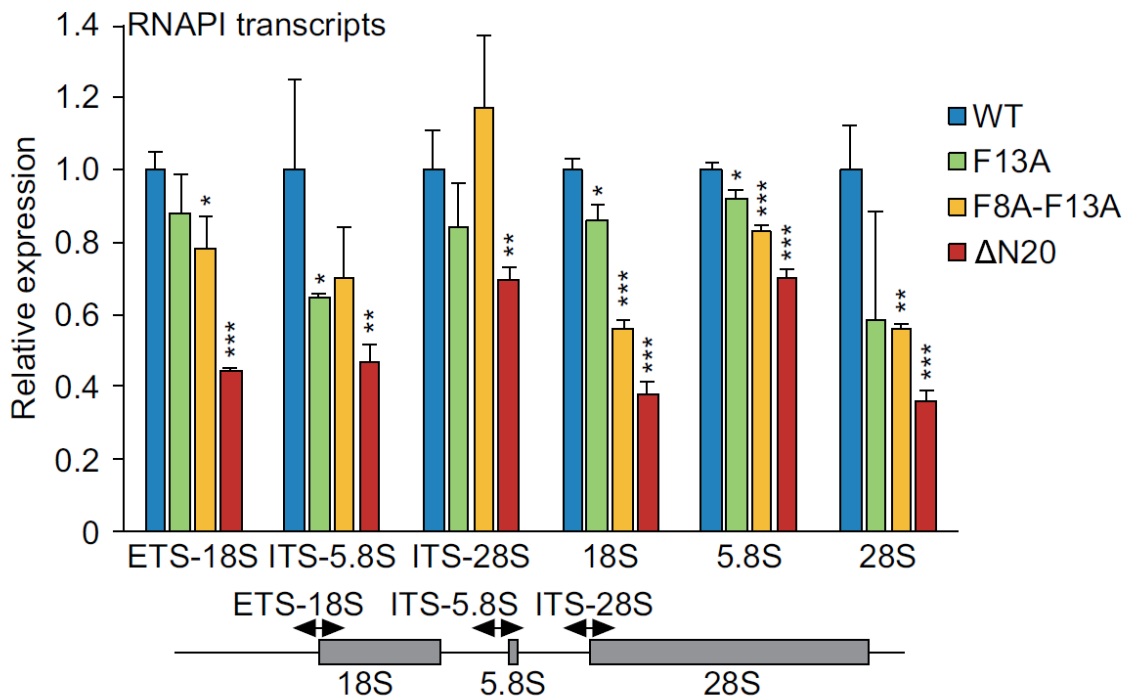


図 3-1 定量 RT-PCR を用いた RNAPI の転写産物量の比較

野生型 RPB6 または変異型 RPB6 発現細胞における、RNAPI の転写産物量を定量 RT-PCR を用いて定量した。解析にはフォワードプライマーがイントロンの領域を認識する前駆体 rRNA 用の 3 つのプライマーセット (ETS-18S、ITS1-5.8S、ITS2-28S) とエクソン内しか増幅しない成熟 rRNA 用の 3 つのプライマーセット (5.8S_rRNA、18S_rRNA、28S_rRNA) を使用した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は p<0.05、**は p<0.01、***は p<0.001 (two-tailed Student's t-test) を表している。

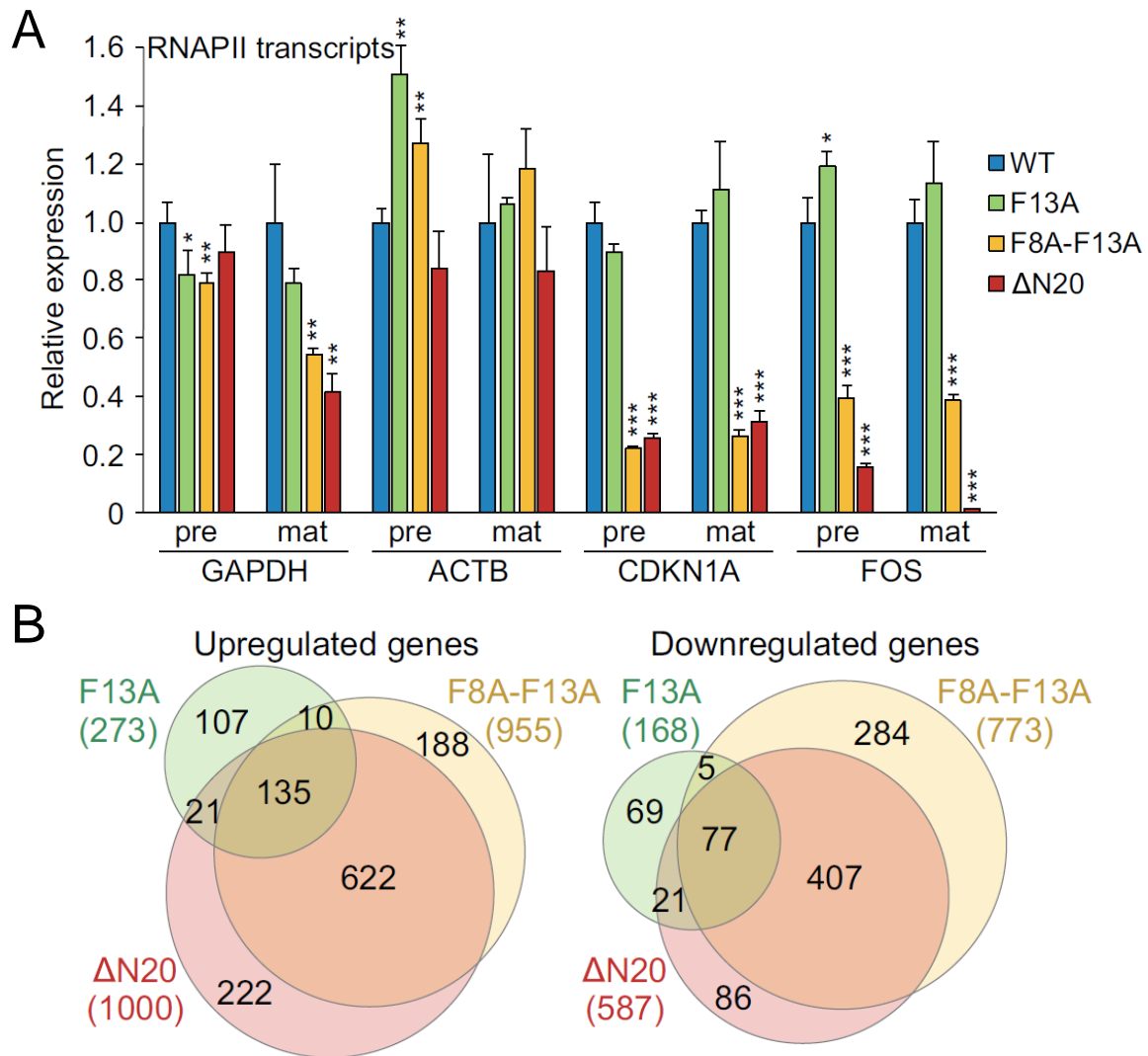


図 3-2 定量 RT-PCR 及び RNA-seq を用いた RNAPII の転写産物量の比較

(A) 野生型 RPB6 または変異型 RPB6 発現細胞における、RNAPII が転写を担う 4 つの遺伝子の発現量を定量 RT-PCR を用いて定量した。pre は前駆体 mRNA の定量結果を、mat は成熟 mRNA の定量結果を表している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ (two-tailed Student's t-test) を表している。(B) 野生型または変異型 RPB6 発現細胞における遺伝子の発現量を RNA-seq を用いて網羅的に解析し、変異型 RPB6 発現細胞において、発現量が増加した遺伝子 (左) と減少した遺伝子 (右) の数をベン図を用いて整理した。発現量の倍率変化が 2 以上かつ、FDR q 値が 0.05 以下の遺伝子を発現変動遺伝子と定義している。

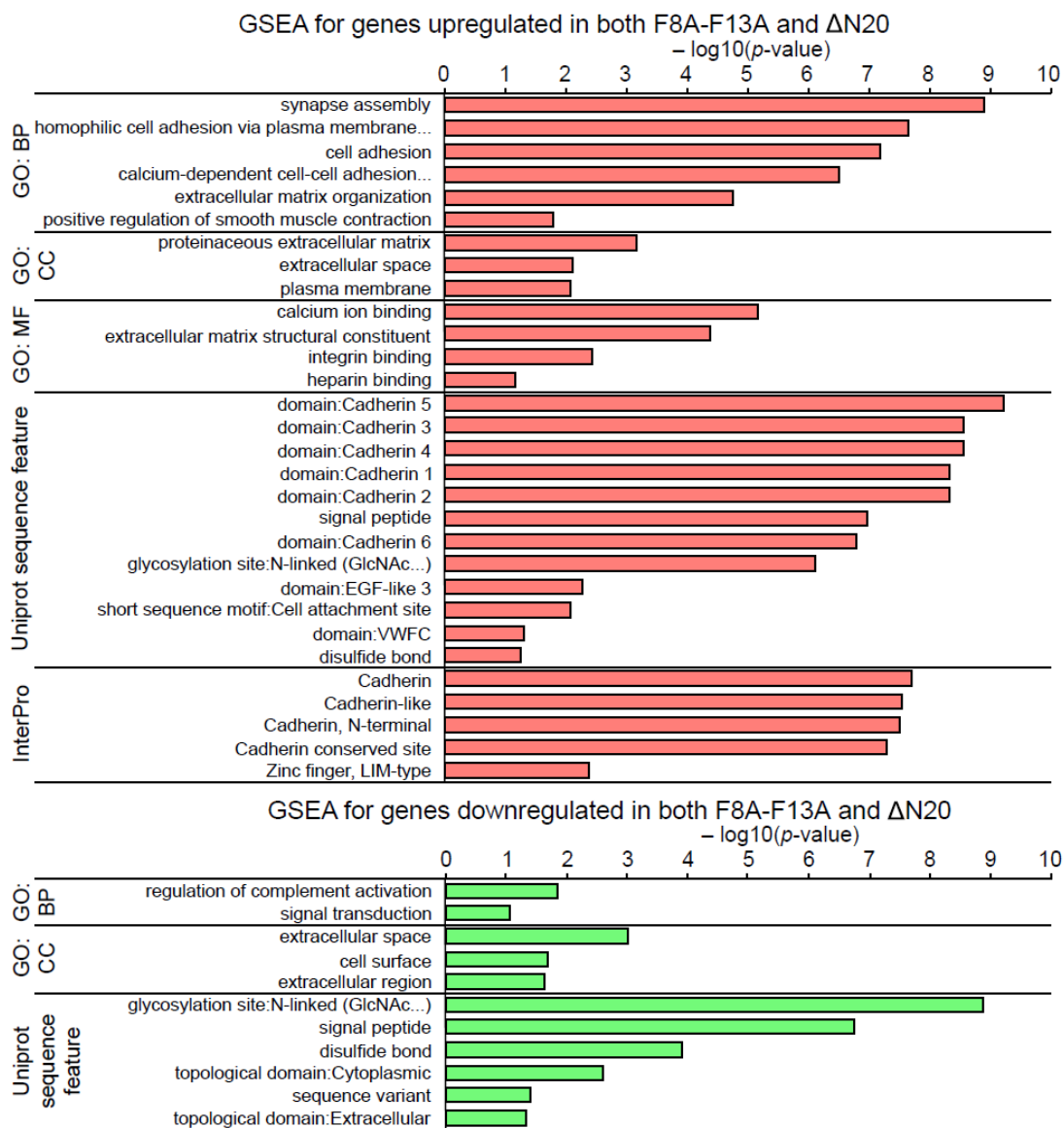


図 3-3 変異型 RPB6 発現細胞において発現量が変動した遺伝子の GSEA

F8A/F13A-RPB6 発現細胞と ΔN20-RPB6 発現細胞の両方で共通して発現量が増加 (上) または減少した (下) 遺伝子群に対して Functional Annotation Tool DAVID を用いて GSEA を行った。グラフの左には優位にエンリッチしていた遺伝子機能名を、右にはその度合いを反映する p 値を示した。

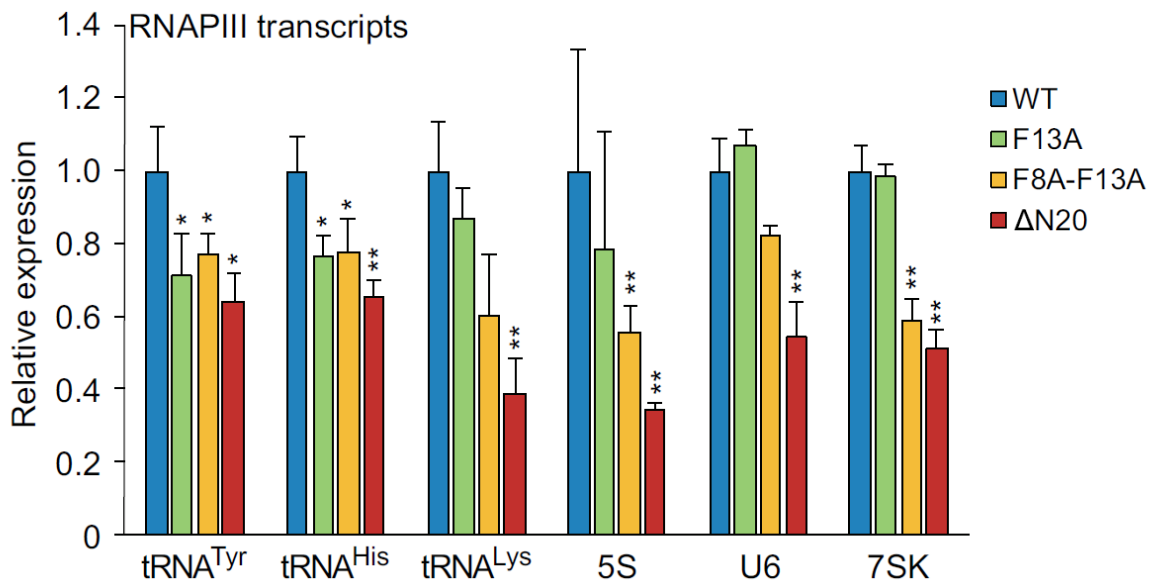


図 3-4 定量 RT-PCR を用いた RNAPIII の転写産物量の比較

野生型 RPB6 または変異型 RPB6 発現細胞における、RNAPIII の転写産物量を定量 RT-PCR を用いて定量した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ (two-tailed Student's t-test) を表している。

第4章 RPB6-TFIIHの相互作用とNER

4.1 緒言

TFIIHはNERにおいて、DNAオープンングを行う非常に重要な因子である [10]。このNERには損傷部位の認識方法が異なる、全ゲノムNERと転写共役型NERの2つの経路が存在する [12]。全ゲノムNERでは、DDB1-DDB2複合体やXPC-RAD23B-Centrin-2複合体によってDNA損傷が位置に関係なくランダムに認識され、その後TFIIHが損傷部位にリクルートされてくる。一方、転写共役型NERでは転写伸長中のRNAPIIがDNA損傷で一時的に停止することで損傷が認識され、その後TFIIHがリクルートされてくる。認識方法の違いはあるが、全ゲノムNERも転写共役型NERもTFIIHのリクルートが反応の要となっている。

本研究の研究対象であるRPB6は全RNAPに共通するサブユニットの1つである [1]。このRPB6を介したRNAPとNERに重要な因子であるTFIIHの相互作用が、NER特に転写共役型NERに関与している可能性がある。本章では、RPB6-TFIIHの相互作用がNERに関与するのか、また関与するのであれば全ゲノムNERと転写共役型NERのどちらに関与するのか明らかにするため研究を行った。

4.2 材料と方法

4.2.1 細胞への紫外線の照射と細胞生存率の測定

35 mm ディッシュ (IWAKI) に 5×10^4 細胞の野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を播種し、37°Cで 24 時間培養した。その後、培養上清を取り除き、1 ml の PBS を用いて洗浄した。PBS を完全に取り除いた細胞に Stratalinker® UV Crosslinker 2400 (Stratagene) を用いて 10 J/m^2 、 20 J/m^2 、 40 J/m^2 の 254 nm の紫外線を照射した。紫外線照射後、各ディッシュに新しい DMEM+10% FBS 培地を 2 ml 加え、37°Cで 72 時間培養した。PBS で 1 回洗浄した後、200 μl の 0.025%トリプシン溶液を加え 37°Cで 1 分間反応させた。その後、800 μl の DMEM+10% FBS 培地を用いて細胞を懸濁し、1.5 ml チューブに回収した。200 G で 5 分間遠心した後、上清を捨て 1 ml の DMEM+10% FBS 培地を用いて細胞を再懸濁した。その細胞懸濁液の濃度を血球計算版を用いて測定し総細胞数を算出した。紫外線を照射していない細胞の細胞数を基準に、細胞の生存率を算出している。この実験は 3 つのバイオロジカルレプリケートを用いて行った。

4.2.2 細胞への白金製剤シスプラチンの処理と細胞生存率の測定

96 ウェルプレートに 3×10^3 細胞の野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を播種し、37°Cで 24 時間培養した。その後、白金製剤シスプラチン (東京化成工業) を終濃度 5 μM 、10 μM 、20 μM になるように添加した 100 μl の DMEM+10% FBS 培地を用いて培地を交換し、37°Cで 72 時間培養した。その後、生細胞数測定試薬 SF を 10 μl ずつ、各ウェルに添加し 37°Cで 1 時間は反応させた。各サンプルの吸光度は GloMax®-Multi Detection System を用いて波長 450 nm、参照波長 600 nm で測定した。シスプラチンを添加していない細胞の吸光度を基準とし細胞生存率を算出している。この実験は 3 つのバイオロジカルレプリケートを用いて行った。

4.2.3 蛍光イメージングによる UDS 及び RRS の測定

蛍光イメージングによる Unscheduled DNA synthesis (UDS) 及び Recovery of RNA synthesis (RRS) の測定実験は [20] を参考に実施した。35 mm ディッシュに直径 15 mm の丸カバーグラス (松浪硝子工業) を入れ、殺菌灯で 15 分紫外線を照射し滅菌した。カバーグラスの

入ったウェルに、 2×10^5 cells/ml に調製した細胞懸濁液を 2 ml 加え 37°C で 16 時間培養した。紫外線を照射するサンプルは、1 ml の PBS で洗浄した後に、Stratalinker® UV Crosslinker 2400 を用いて細胞に 254 nm の紫外線を 40 J/m^2 で照射し、速やかに 2 ml の DMEM+10% FBS 培地を加えた。シスプラチンを処理するサンプルは、終濃度 $100 \mu\text{M}$ になるようにシスプラチンを添加し 2 時間培養した後に、速やかに 2 ml の DMEM+10% FBS 培地で培地を交換した。その後、UV またはシスプラチンによる損傷を回復させるために、一定時間 (UDS の測定では 0 時間と 2 時間、6 時間; RRS の測定では 0 時間と 2 時間、6 時間、24 時間) 37°C で培養した。その後、UDS の測定では終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) (東京化成工業) を、RRS の測定では終濃度が $100 \mu\text{M}$ になるように 5-ethynyluridine (EU) (Toronto Research Chemicals) を添加した無血清 DMEM 培地中にカバーグラスを移し、37°C で 2 時間 (UDS) または 1 時間 (RRS) 培養した。カバーグラスを PBS で 3 回洗浄した後、2% パラホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich) と 0.5% triton X-100 (ナカライテスク)、300 mM スクロース (ナカライテスク) を含む PBS にカバーグラスを入れ、20 分間氷上で反応させることで、細胞の固定化と透過処理を同時に行った。その後、PBS-T (0.05% Tween20 を含む PBS) を用いて 3 回洗浄し、10% FBS を含む PBS にカバーグラスを入れ、室温で 30 分間反応させることで細胞をブロッキングした。PBS-T を用いてカバーグラスを 1 回洗浄した後、 $25 \mu\text{M}$ Alexa Fluor 488-azide (Thermo Fisher Scientific) と 4 mM CuSO_4 、10 mM アスコルビン酸ナトリウムを含むトリス緩衝生理食塩水 $50 \mu\text{l}$ をパラフィルム上で 1 時間カバーグラス上の細胞に反応させた。PBS-T を用いて 3 回洗浄した後、Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) を封入してカバーグラスをスライドグラスに接着させた。蛍光写真の撮影は正立共焦点顕微鏡 LSM780 (Zeiss) を使用し、その解析には CellProfiler [21] を使用した。DAPI のシグナルは核の領域を定義するのに使用し、定義された核の領域の Alexa Fluor 488 のシグナルを定量し核内の平均蛍光強度を算出した。UDS の解析では、核内の平均蛍光強度をヒストグラムを用いて整理した。その際、蛍光強度の異なる 2 つのピークが検出され、その 2 つのピークの内より強度の強いピークを S 期由来のピークと判断し解析から除外した。少なくとも 250 個以上の S 期以外の細胞を解析対象として用いた。RRS の解析では少なくとも 125 個以上の胞を解析対象として用いた。

4.2.4 定量 PCR を用いた個々の遺伝子における RRS の測定

100 μ M のシスプラチンを含む DMEM+10% FBS 培地で、WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞を 37°C で 2 時間培養する。その後、シスプラチンを含まない DMEM+10% FBS 培地で培地交換し、シスプラチンによる損傷を一定時間 (0 時間、2 時間、6 時間、24 時間) 回復させた。次に 100 μ M の EU を含む無血清 DMEM 培地で培養上清を交換し 1 時間培養した。同時に、スパイク・インとして用いる昆虫細胞 Sf9 も 100 μ M の EU を含む Sf-900 II SFM (Thermo Fisher Scientific) を用いて 27°C で 1 時間培養した。WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞、そして Sf9 細胞から totalRNA を Sepasol RNA I Super G を用いて精製した後、Sf9 細胞の totalRNA を定量 PCR のスパイク・インとして WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の totalRNA に等量混合した。その後、totalRNA に含まれる EU で標識された新生 RNA を Click-iT Nascent RNA Capture Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてビオチン化し、エタノール沈殿によって非ビオチン化 RNA も含め精製した。次に、Click-iT Nascent RNA Capture Kit を用いビオチン化された新生 RNA を、Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads (Thermo Fisher Scientific) 上に固定化した。ビーズ上に固定化された新生 RNA を SuperScrip III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) と、6 つの遺伝子 (28S、18S、GAPDH、ACTB、7SK、5S) に特異的なリバースプライマー (表 3.1) 及び、昆虫の GAPDH に特異的なリバースプライマーを用いて逆転写した。反応液を 70°C で 15 分加熱し酵素を非働化させ、さらに 85°C で 5 分間加熱し逆転写された DNA をビーズから遊離させた。定量 PCR の反応液の調製には KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism (KAPA Biosystems) と 6 つの遺伝子 (28S、18S、GAPDH、ACTB、7SK、5S) 特異的なプライマーセット (表 3-1) 及び、昆虫の GAPDH に特異的なプライマーセットを使用し、StepOnePlus Real Time PCR System を用いて発現量を解析した。この実験は 3 つのバイオリカルレプリケートを用いて行った。また昆虫の GAPDH に特異的なプライマーの配列は以下に示す。

Insect_GAPDH_Fwd: 5'-TGTTGACGGACCCTCTGGAA-3'

Insect_GAPDH_Rev: 5'-ACGGGAACACGGAAAGCCAT-3'

4.3 結果

4.3.1 RPB6-TFIIH の相互作用は NER に重要である

RPB6-TFIIH の相互作用が NER に関与するのか調べるため、NER によって修復される損傷を誘発する紫外線を野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞に照射し、紫外線への耐性を比較した。その結果、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞は WT-RPB6 発現細胞に比べ、紫外線に対し高い感受性を示すことが分かった (図 4-1A と B)。さらに、紫外線と同様に、NER によって修復される損傷を誘発する白金製剤シスプラチンへの耐性も比較した。その結果、変異型 RPB6 発現細胞は WT-RPB6 発現細胞に比べてシスプラチンに対し、高い感受性を示すことが分かった (図 4-1C と D)。これらの結果から、変異型 RPB6 発現細胞では NER の機能欠損が起こっていると考えられ、RPB6-TFIIH の相互作用が NER において重要であることが分かった。

4.3.2 RPB6-TFIIH の相互作用は全ゲノム NER に必須ではないが関与している

NER には全ゲノム NER と転写共役型 NER の 2 種類が存在する。RPB6-TFIIH の相互作用がどちらの経路に関与しているのか明らかにするため、その切り分けを試みた。まず、RPB6-TFIIH の相互作用が全ゲノム NER に関与しているのか調べるため UDS を用いて全ゲノム NER 活性を評価した。UDS はその名の通り、『計画されていない DNA 合成』のことで、『計画されている DNA 合成』である DNA 複製以外の DNA 合成、つまり、『損傷修復時になされる DNA 合成』のことである。一般的に UDS は全ゲノム NER 活性の評価に用いられている [21]。本研究では、この UDS を用いて WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の全ゲノム NER 活性を比較することにした。UDS の定量には、チミジンアナログである EdU を利用した。紫外線またはシスプラチンを処理した細胞の培養上清に EdU を添加し、DNA 損傷が修復される際に EdU を新生 DNA に取り込ませた。新生 DNA 内の EdU をクリックケミストリーを用いて Alexa Fluor 488-azide と結合させ、その蛍光強度を測定することで UDS を定量した。その結果、WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の両方で UDS が検出された (図 4-2)。しかし、この検出された UDS の程度は、WT-RPB6 発現細胞に比べて F8A/F13A-RPB6 発現細胞でわずかに低下していた。つまり、RPB6-TFIIH の相互作用が失われても、わずかに活性が落ちる程度で全ゲノム NER は起こってい

た。この結果は RPB6-TFIIH の相互作用が全ゲノム NER に必須ではないが、関与していることを示唆している。

4.3.3 RPB6-TFIIH の相互作用は転写共役型 NER において重要である

次に、RPB6-TFIIH の相互作用が転写共役型 NER に関与しているのか明らかにするため、RRS を用いて転写共役型 NER 活性を評価した。転写共役型 NER は転写伸長中の RNAPII が DNA 損傷で一時停止することで開始する。停止していた RNAPII による転写は損傷の修復が終わると再開される。つまり、RNA 合成の回復量 RRS から転写共役型 NER による損傷修復活性を評価することができる [22]。本研究では、この RRS を用いて WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の転写共役型 NER 活性を比較することにした。RRS の定量には、ウリジンアナログである EU を利用した。紫外線またはシスプラチンを処理した細胞の培養上清に EU を添加し、新生 RNA に EU を取り込ませた。新生 RNA 内の EU をクリックケミストリーを用いて Alexa Fluor 488-azide と結合させ、その蛍光強度を測定することで新生 RNA の定量を行った。その結果、紫外線またはシスプラチンの処理によって減少した WT-RPB6 発現細胞の新生 RNA 量が、処理 24 時間後にはほぼ完全に回復している様子が検出された (図 4-3、図 4-4、図 4-5A と C)。しかし、紫外線またはシスプラチンの処理によって減少した F8A/F13A-RPB6 発現細胞の新生 RNA 量は、処理 24 時間後においても減少したままであった (図 4-3、図 4-4、図 4-5B と D)。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞では転写共役型 NER の機能欠損が起こっており、RPB6-TFIIH の相互作用が転写共役型 NER において重要であることを示唆している。

4.3.4 RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI と RNAPII の転写共役型 NER に重要である

転写共役型 NER の活性を蛍光強度を用いて新生 RNA 量から評価するという 4.3.3 で説明した方法では、合成量が多い rRNA を主に検出してしまう。新生 RNA を蛍光検出した顕微鏡写真 (図 4-3 と図 4-4) において、核小体が周囲よりも明るく染色されていることから、その事実は明らかである。rRNA は RNAPI の転写産物であり、4.3.3 の実験では転写共役型 NER が起こる RNAPII の転写共役型 NER 活性を正確に評価できていないと考えられた。そこで次に、転写共役型 NER の活性を転写を担う RNAP を区別して定量することにし

た。まず、シスプラチン処理後の細胞に 4.4.3 と同じく EU を添加し EU を新生 RNA に取り込ませた。その後、biotin-azide をクリック反応を用いて新生 RNA 内の EU と結合させ、ビオチン化された新生 RNA をストレプトアビジンビーズを用いて精製した。その新生 RNA を RNAPI と RNAPII、RNAPIII が転写を担うそれぞれの遺伝子に対するプライマーを用いて定量するという方法で、転写を担う RNAP を区別して新生 RNA 量を解析した。その結果、WT-RPB6 発現細胞ではシスプラチン添加直後 3 割程度まで減少した RNAPI と RNAPII の転写産物量が、24 時間後には 6 割程度まで回復している様子が検出された (図 4-6A)。一方で、F8A/F13A-RPB6 発現細胞ではシスプラチン添加直後減少した RNAPI と RNAPII の転写産物量が、24 時間後においても減少したままだった (図 4-6B)。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞では RNAPI と RNAPII が転写を担う遺伝子の転写共役型 NER が機能欠損していた。また RNAPIII の転写産物量は WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞のどちらにおいても、シスプラチンの添加後減少していなかった (図 4-6)。この結果は RNAPIII が転写を担う遺伝子に、RRS を検出するに足る DNA 損傷を入れることができなかったことを示している。RNAPIII については検証できていないが、本研究結果から少なくとも RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI 及び RNAPII の転写共役型 NER に重要であることが分かった。

4.4 本章のまとめ

TFIIH は NER において、DNA オープニングを行う非常に重要な因子である [10]。そこで本章では、この TFIIH と RPB6 の相互作用が NER に関与しているのか調べた。まず、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞の紫外線とシスプラチンに対する感受性を比較した結果、変異型 RPB6 発現細胞の感受性が高いことが分かった。この結果は RPB6-TFIIH の相互作用が NER に重要であることを示唆している。

次に、RPB6-TFIIH の相互作用が、全ゲノム NER と転写共役型 NER のどちらに関与しているのか、WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の UDS と RRS を比較解析することで調べた。その結果、UDS は WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の両方で検出されたが、その程度は F8A/F13A-RPB6 発現細胞においてわずかに低下していた。また、RRS は WT-RPB6 発現細胞では検出できたが、F8A/F13A-RPB6 発現細胞ではほとんど検出できなかった。これらの結果は、RPB6-TFIIH の相互作用が全ゲノム NER と転写共役型 NER に両方に関与し、転写共役型 NER については必須であることを示唆している。

RPB6 は全 RNAP に共通するサブユニットであるため、RPB6-TFIIH の相互作用は全 RNAP の転写共役型 NER に関与している可能性がある。そこで次に、転写共役型 NER の活性を転写を担う RNAP を区別して定量した。その結果、RNAPI と RNAPII が転写を担う遺伝子で転写共役型 NER が起こっており、その転写共役型 NER に RPB6-TFIIH の相互作用が関与していることが分かった。

4.5 図表

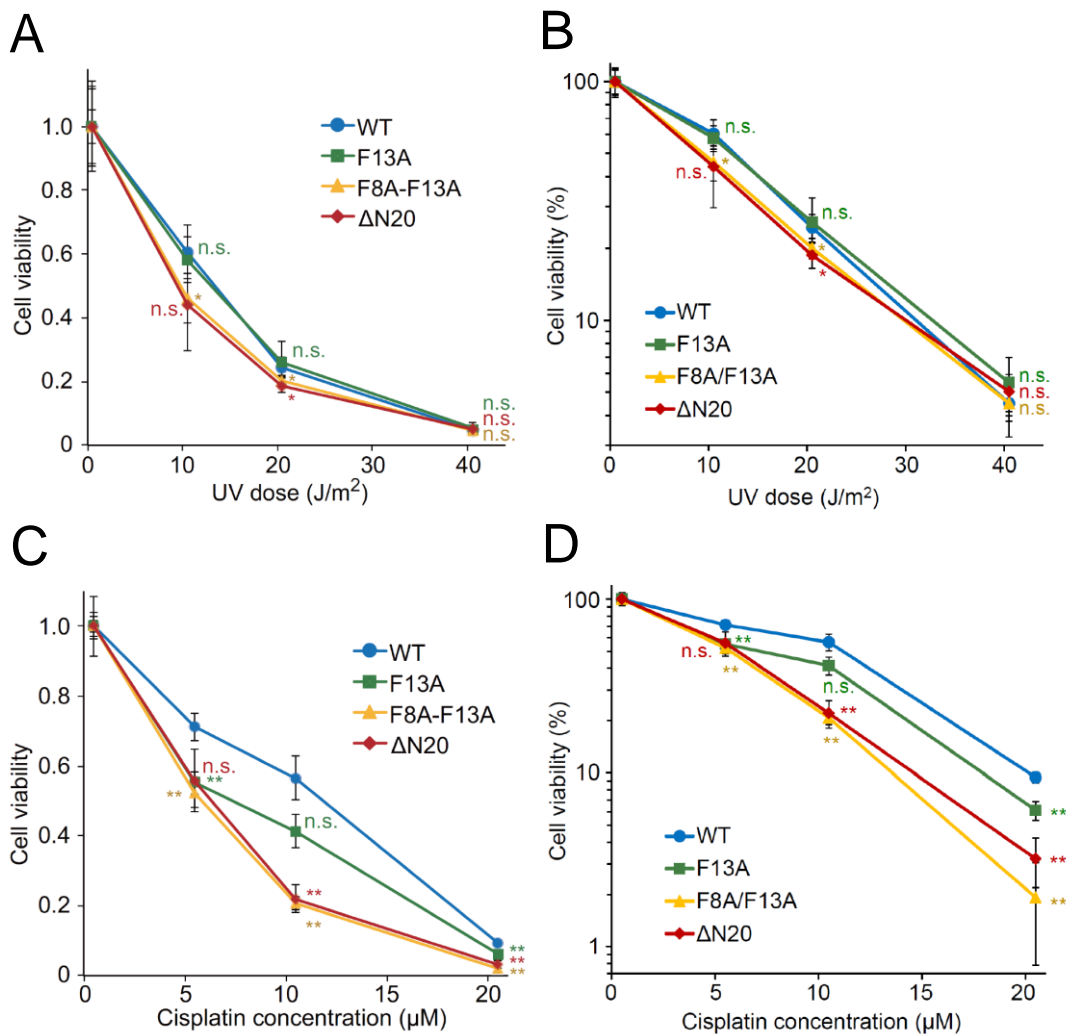


図 4-1 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞の紫外線及びシスプラチンに対する感受性

(A と B) UV-C 照射後の細胞生存率をまとめたグラフ。254 nm の UV-C を細胞に照射し 72 時間後の細胞数を測定した。UV-C を照射していない細胞の数を基準に生存率を算出している。(C と D) シスプラチン添加後の細胞生存率をまとめたグラフ。シスプラチンを細胞に添加し 72 時間後の細胞数を測定した。シスプラチンを添加していない細胞の数を基準に生存率を算出している。(A と B、C、D) エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は p<0.05、**は p<0.01 (two-tailed Student's t-test) を、n.s.は有意差がなかったことを表している。また、細胞生存率は線形スケール (A と C) と対数スケール (B と D) のそれぞれを用いて整理した。

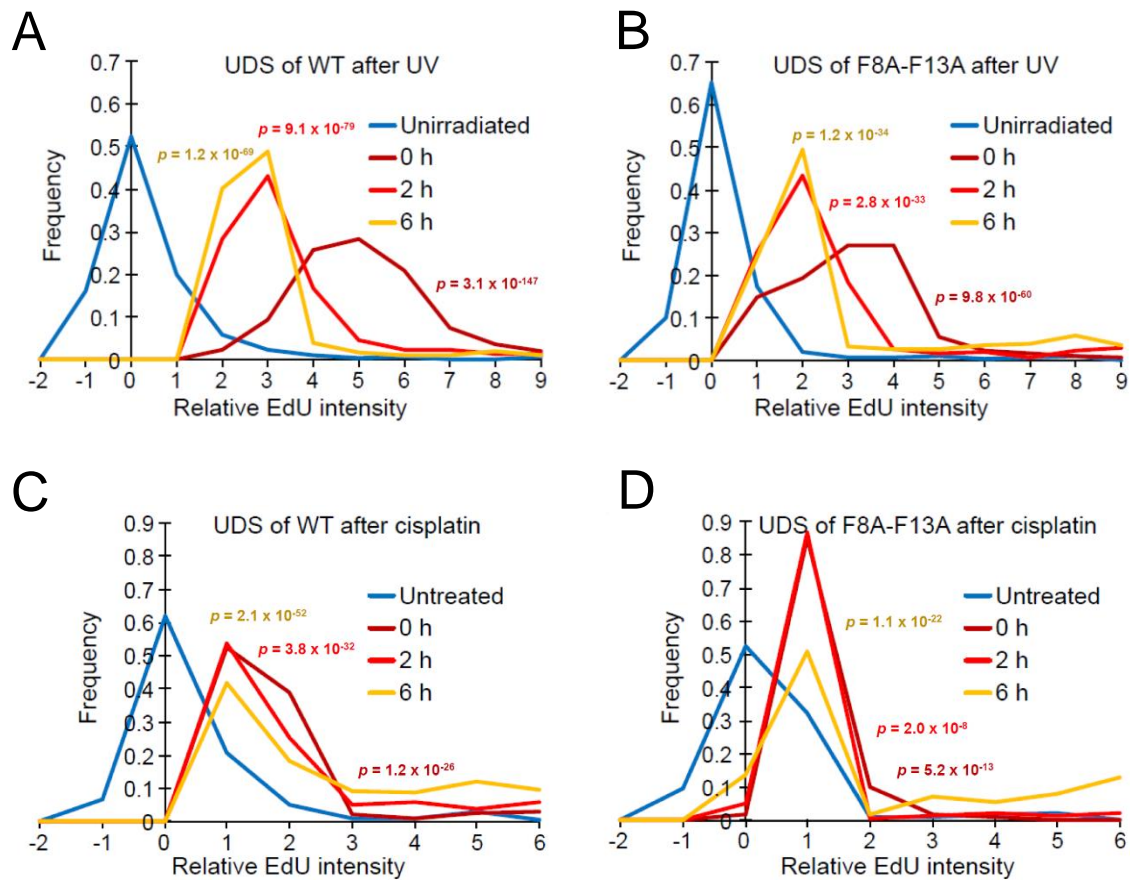


図 4-2 WT-RPB6 及び F8A/F13A-RPB6 発現細胞における全ゲノム NER 活性

40 J/m²の UV-C 照射 (A と B) または 100 μM のシスプラチン 2 時間処理 (C と D) 後の、WT-RPB6 発現細胞 (A と C) と F8A/F13A-RPB6 発現細胞 (B と D) の UDS をヒストグラムを用いて整理した。新生 DNA は EdU を用いて標識し、Alexa Fluor 488-azide を用いて可視化した。凡例は UV-C またはシスプラチン処理の有無と、処理後の回復時間を表している。核内における平均蛍光強度を対数変換した後、コントロール細胞の平均蛍光強度を用いて正規化し、ヒストグラムとして整理した。各条件において、少なくとも 250 個以上の S 期以外の細胞を解析対象として用いた。また、two-tailed Student's t-test を用いて算出した p 値をグラフ上部に示した。

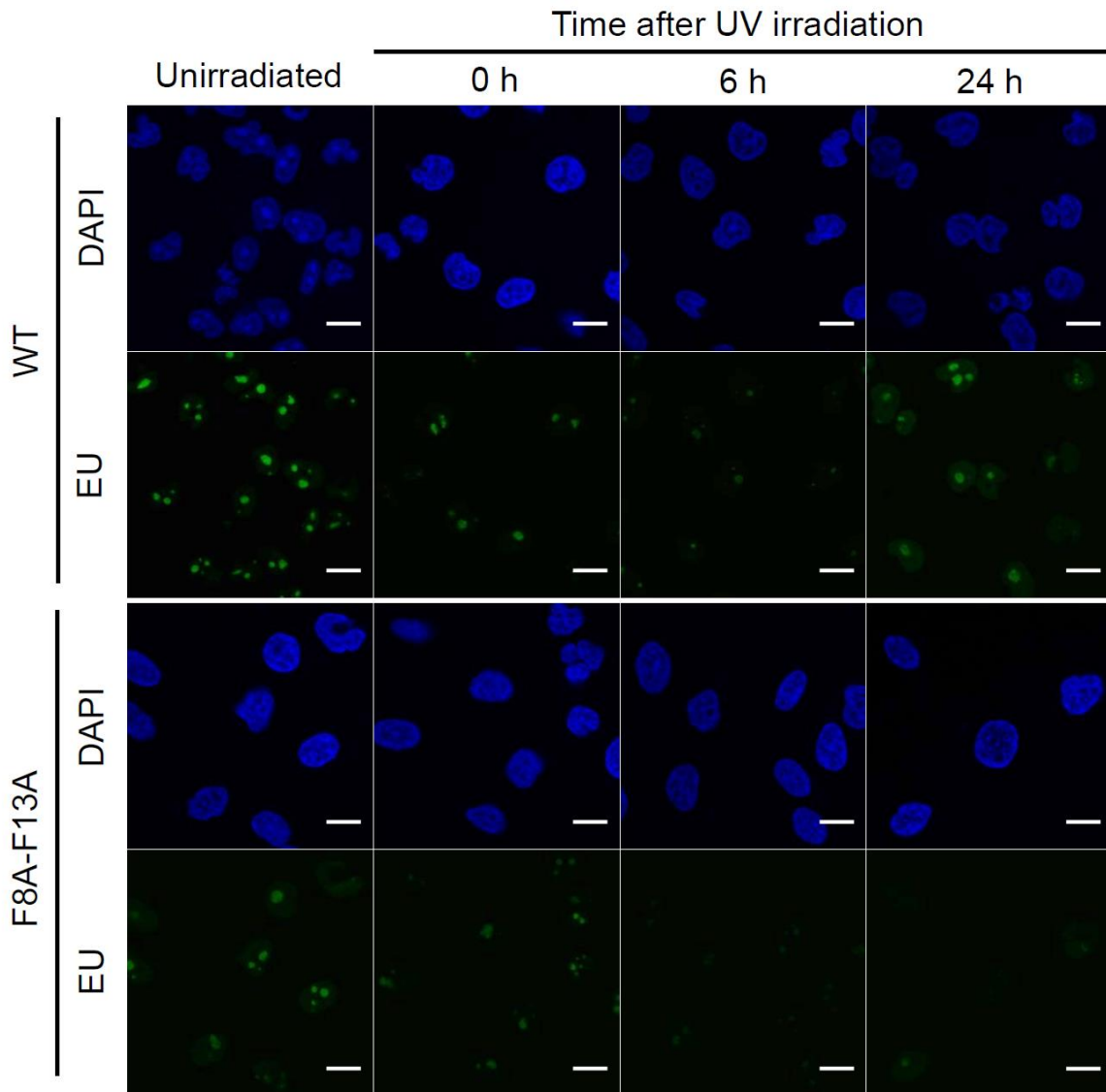


図 4-3 紫外線照射後の WT-RPB6 及び F8A/F13A-RPB6 発現細胞における新生 RNA

40 J/m² の UV-C を照射した細胞と、照射していない細胞における新生 RNA 量を蛍光顕微鏡を用いて解析した。写真上部には UV-C 照射後の回復時間を示した。新生 RNA は EU を用いて標識し、Alexa Fluor 488-azide を用いて可視化した。また、核は DAPI を用いて染色している。スケールバーは 10 μm を表している。

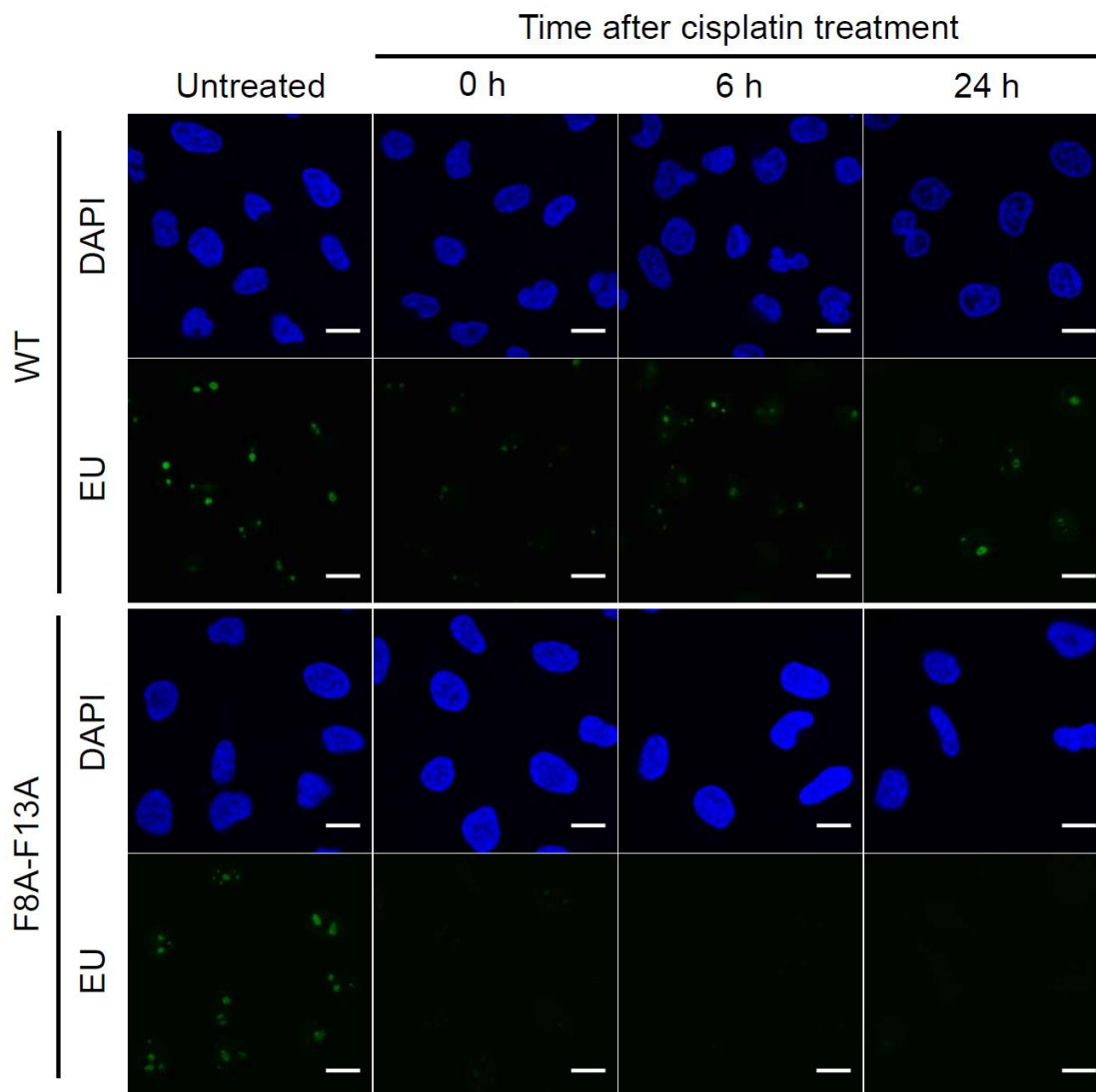


図 4-4 シスプラチン処理後の WT-RPB6 及び F8A/F13A-RPB6 発現細胞における新生 RNA 100 μ M のシスプラチンを 2 時間処理した細胞と、処理していない細胞における新生 RNA 量を蛍光顕微鏡を用いて解析した。写真上部にはシスプラチン処理後の回復時間を示した。新生 RNA は EU を用いて標識し、Alexa Fluor 488-azide を用いて可視化した。また、核は DAPI を用いて染色している。スケールバーは 10 μ m を表している。

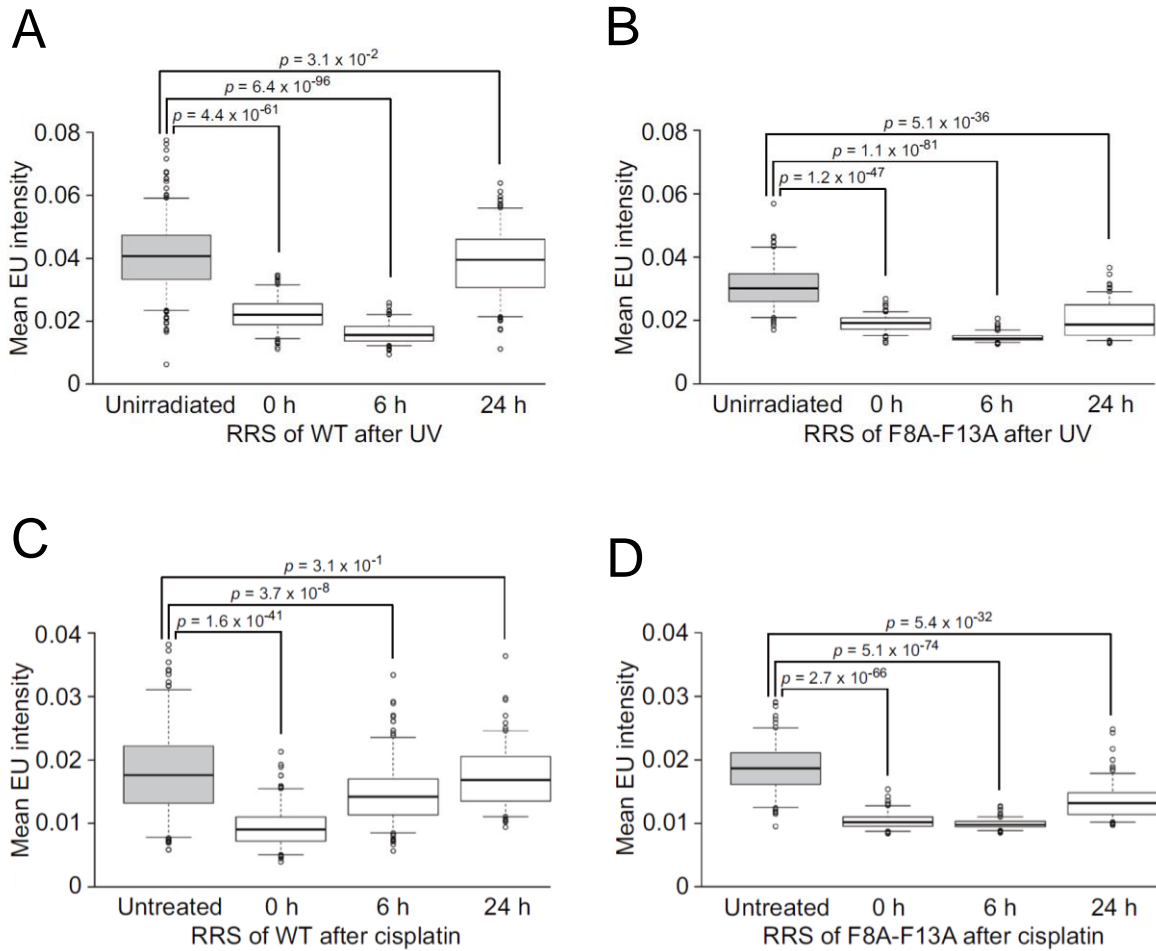


図 4-5 WT-RPB6 及び F8A/F13A-RPB6 発現細胞における転写共役型 NER 活性

40 J/m²の UV-C 照射 (A と B) または 100 μM のシスプラチン 2 時間処理 (C と D) を行った、WT-RPB6 発現細胞 (A と C) と F8A/F13A-RPB6 発現細胞 (B と D) の RRS を箱ひげ図を用いて整理した。グラフ下には UV-C またはシスプラチン処理の有無と、処理後の回復時間を示した。新生 RNA は EU を用いて標識し、Alexa Fluor 488-azide を用いて可視化した。すべての条件で、125 個以上の細胞が解析に用いられている。two-tailed Student's t-test を用いて算出した p 値をグラフ上部に示した。また、ひげは 5%点と 95%点を表し、ドットは外れ値を表している。

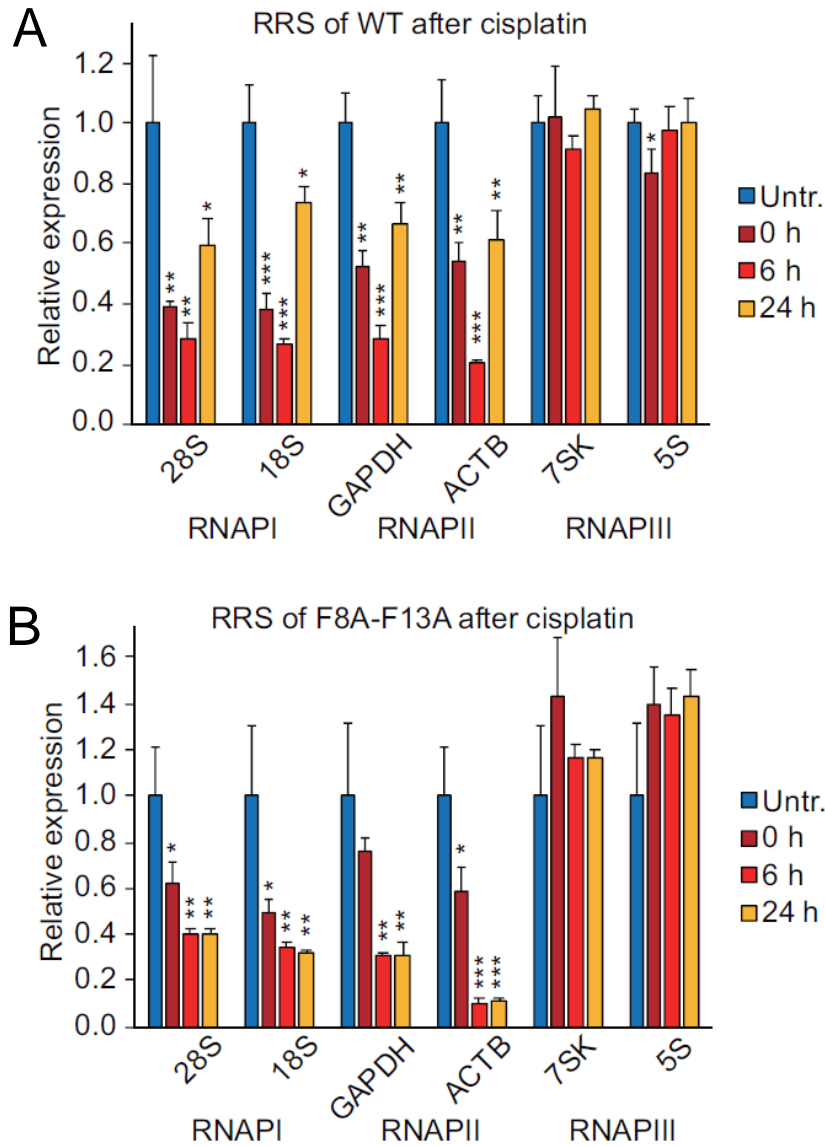


図 4-6 遺伝子を区別した転写共役型 NER 活性の比較

100 μ M のシスプラチンを 2 時間処理した後の、WT-RPB6 発現細胞 (A) と F8A/F13A-RPB6 発現細胞 (B) の RRS を定量 PCR を用いて遺伝子ごとに区別して定量した。グラフ下には定量した遺伝子とその転写を担う RNAP を示した。また凡例はシスプラチン処理の有無と、処理後の回復時間を示している。新生 RNA は EU を用いて標識後、biotin-azide を用いてビオチン化した。その後、アビジン精製を行い新生 RNA 精製後、定量 PCR を用いて解析した。(A と B) エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は p<0.05、**は p<0.01、***は p<0.001 (two-tailed Student's t-test) を表している。

第 5 章 変異型 RPB6 発現細胞で見られた表現型の変化の因果関係

5.1 緒言

RPB6-TFIIH の相互作用の機能的意義を明らかにするため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を用いた表現型の比較解析を行ってきた。その結果、変異型 RPB6 発現細胞では細胞増殖速度の鈍化 (2 章) と、RNAPI と RNAPII、RNAPIII の転写反応の変化 (3 章)、NER の機能欠損 (4 章) の 3 つの表現型の変化が検出された。どの表現型の変化も、その根源たる原因は RPB6 と TFIIH の相互作用の欠損であるが、いずれかの表現型の変化による 2 次的な表現型である可能性がある。そこで本章では、これら 3 つの表現型の変化がそれぞれ独立して起こっている変化なのか、それともいずれかの表現型による 2 次的な変化なのか明らかにするため研究を行った。

5.2 材料と方法

5.2.1 RNAPI 阻害剤 BMH21 を用いた遺伝学的解析

【細胞増殖】

WT-RPB6 発現細胞を 0.1 μM の BMH-21 存在下と非存在下で 96 時間培養し、細胞数を血球計算盤を用いて数えた。

【転写産物量の定量】

WT-RPB6 発現細胞を 0.1 μM または 0.3 μM の BMH-21 存在下と非存在下で 4 日間培養し、その後 totalRNA を精製した。このサンプルの定量 RT-PCR は 3.2.1 と同様のプロトコルで行い、3.2.2 と同じプライマーを用いた。

【シスプラチン処理時の細胞生存率】

WT-RPB6 発現細胞を 0.1 μM の BMH-21 存在下または非存在下で 1 週間培養した。シスプラチンの処理と細胞生存率の測定は 4.2.2 と同様のプロトコルで行った。

5.2.2 RNAPIII 阻害剤 ML60218 を用いた遺伝学的解析

【細胞増殖】

WT-RPB6 発現細胞を 40 μM または 50 μM の ML60218 存在下と非存在下で 96 時間培養し、細胞数を血球計算盤を用いて数えた。

【転写産物量の定量】

WT-RPB6 発現細胞を 40 μM または 50 μM の ML60218 存在下と非存在下で 72 時間培養し、その後 totalRNA を精製した。このサンプルの定量 RT-PCR は 3.2.1 と同様のプロトコルで行い、3.2.2 と同じプライマーを用いた。

【シスプラチン処理時の細胞生存率】

WT-RPB6 発現細胞を 40 μM または 50 μM の ML60218 存在下と非存在下で 72 時間培養した後、シスプラチンを添加した。細胞生存率の測定は 4.2.2 と同様のプロトコルで行った。

5.2.3 活性酸素種除去剤 N-アセチル-L-システインを用いた遺伝学的解析

【増殖曲線】

WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞を 3 μM の N-アセチル-L-システイン (NAC)

存在下と非存在下で1週間程度培養した。これらの細胞を2.2.8と同様のプロトコルで培養し、細胞数を播種の3日後、7日後、11日後に測定した。倍加時間は各細胞の増殖曲線から算出した。

【転写産物量の定量】

WT-RPB6発現細胞とF8A/F13A-RPB6発現細胞を3 μ MのNAC存在下と非存在下で1週間程度培養した。これらの細胞の定量RT-PCRは3.2.1と同様のプロトコルで行い、3.2.2と同じプライマーを用いた。

5.3 結果

5.3.1 RNAPI の転写産物の減少は細胞の増殖に影響を与えない

まず、RNAPI の転写産物量の減少が細胞増殖速度鈍化の原因であるか調べるため、RNAPI 阻害下での細胞増殖を調べた。RNAPI の阻害には RNAPI 阻害剤である BMH-21 を使用した [22]。まず、変異型 RPB6 発現細胞で検出された RNAPI の転写産物量の減少と同程度、転写産物量が減少する BMH-21 の処理条件を調べた。その結果、BMH-21 を 0.1 μM で細胞に処理すると 6 割程度まで、0.3 μM で処理すると 3 割程度まで転写産物量が減少することが分かった (図 5-1A)。変異型 RPB6 発現細胞での転写産物量の減少は 8 割から 4 割程度なので、本研究では 0.1 μM で BMH-21 を処理することにした。次に、RNAPI の転写産物量の減少が細胞増殖に影響するのか調べるため、WT-RPB6 発現細胞に 0.1 μM の BMH-21 を 96 時間処理し、未処理の細胞と細胞数を比較した。その結果、0.1 μM の BMH-21 の処理は細胞の増殖に影響しなかった (図 5-1B)。この結果は、変異型 RPB6 発現細胞で観察された RNAPI の転写産物量の減少が、細胞増殖速度の鈍化の原因ではないことを示唆している。

5.3.2 RNAPI の転写産物の減少は NER の機能欠損に関与しない

次に、RNAPI の転写産物量の減少が NER の機能欠損に関与しているのか調べるため、RNAPI 阻害下でのシスプラチンへの耐性を調べた。WT-RPB6 発現細胞に 0.1 μM の BMH-21 を 1 週間程度処理し、RNAPI の転写産物量を減少させた。その後、細胞に様々な濃度のシスプラチンを 72 時間処理し細胞数を測定した。その結果、BMH-21 を処理した細胞と処理していない細胞でシスプラチンに対する耐性に変化はなかった (図 5-1C と D)。この結果は、RNAPI の転写産物量の減少が NER の機能欠損の原因ではないことを示唆している。

5.3.3 RNAPIII の転写産物の減少は細胞増殖を阻害する

RNAPIII の転写産物量の減少が、細胞増殖速度鈍化の原因であるか明らかにするため、RNAPIII 阻害下での細胞増殖を調べた。RNAPIII の阻害には RNAPIII の broad-spectrum 阻害剤である ML60218 を使用した [23]。まず変異型 RPB6 発現細胞で検出された RNAPIII の転写産物量の減少と同程度、転写産物量が減少する ML60218 の処理条件を調べた。その結果、ML60218 を 40 μM または 50 μM で細胞に処理すると 8 割から 5 割程度まで転写産

物量が減少することが分かった (図 5-2A)。変異型 RPB6 発現細胞での転写産物量の減少は 8 割から 4 割程度なので、本研究では 40 μ M と 50 μ M の両方で ML60218 を使用することにした。次に、RNAPIII の転写産物量の減少が細胞増殖に影響するのか調べるため、WT-RPB6 発現細胞に 40 μ M と 50 μ M の ML60218 を 96 時間処理し、未処理の細胞と細胞数を比較した。その結果、40 μ M の ML60218 処理で 2 割程度、50 μ M の ML60218 処理で 4 割程度細胞数が減少していた (図 5-2B)。この結果は、RNAPIII の転写産物量の減少が細胞増殖速度鈍化の原因のひとつであることを示唆している。

5.3.4 RNAPIII の転写産物の減少は NER の機能欠損に関与しない

次に、RNAPIII の転写産物量の減少が、NER の機能欠損に関与しているのか明らかにするため、RNAPIII 阻害下でのシスプラチンへの耐性を調べた。まず、WT-RPB6 発現細胞に 40 μ M と 50 μ M の ML60218 を 72 時間処理し、RNAPIII の転写産物量をあらかじめ減少させた。その後、細胞に様々な濃度のシスプラチンを 72 時間処理し細胞数を測定した。その結果、意外なことに ML60218 を処理した細胞は処理していない細胞にくらべ、シスプラチンに対する耐性が高くなることが分かった (図 5-2C と D)。この結果は、RNAPIII の転写産物量の減少が NER の機能欠損に関与していないことを示唆している。

5.3.5 Essential 遺伝子の発現量の低下が細胞増殖速度鈍化の原因の 1 つである

次に、RNAPII の転写反応の変化が細胞増殖速度の鈍化に関与しているのか明らかにするため、HeLa 細胞の生存に必須である遺伝子の発現量が低下しているか、RNA-seq の結果を再解析した。Essential 遺伝子のデータベースである OGEE にて HeLa 細胞の Essential 遺伝子に分類されている 335 遺伝子の発現量を調べたところ、4 つの遺伝子 (*KRT16*、*BIRC7*、*IRX3*、*FAM105A*) の発現量が 5 分の 1 以下まで、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞で共通して減少していた。また、これら 4 つの遺伝子は F13A-RPB6 発現細胞では発現量が減少しておらず、F8A/F13A-RPB6 発現細胞と Δ N20-RPB6 発現細胞で観察された細胞増殖速度の鈍化の原因である可能性がある。

5.3.6 NER の機能欠損は関連遺伝子の発現量の変化が原因ではない

次に、RNAPII の転写反応の変化が NER の機能欠損に関与しているのか調べるため、NER

関連遺伝子の発現量が変化しているか RNA-seq の結果を再解析した。NER に関連する遺伝子として KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway において Nucleotide excision repair (map03420) に分類されている 29 遺伝子の発現量を調べた。その結果、関連遺伝子の中に発現量の倍率変化が 2 以上のものは存在しなかった (図 5-3)。この結果は、NER 関連遺伝子の発現量の変化が NER の機能欠損の原因ではないことを示唆している。

5.3.7 NER の機能欠損は細胞増殖速度鈍化の原因の 1 つである

次に NER の機能欠損が他の表現型の変化に関与しているのか調べた。NER によって修復される損傷の内、シスプラチンや紫外線を処理していない条件でも起こる損傷には、常に DNA に損傷を入れ続けている活性酸素種 (ROS) が存在する [24]。本研究では、この ROS を除去する化合物である NAC を細胞に添加することで、NER の機能欠損による ROS の蓄積を打ち消し [24]、変異型 RPB6 発現細胞で観察された細胞増殖速度の鈍化と転写反応の変化に影響が見られるか調べた。まず、NER の機能欠損が細胞増殖速度の鈍化に関与しているのか調べるため、NAC の添加によって WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の増殖速度が変化するか調べた。その結果、WT-RPB6 発現細胞の倍化時間は NAC の添加によってほとんど変化しなかったが、F8A/F13A-RPB6 発現細胞における細胞増殖速度の鈍化は NAC の添加によって部分的に改善した (図 5-4)。つまり、F8A/F13A-RPB6 発現細胞における増殖速度の鈍化は ROS によるダメージの蓄積が原因の 1 つであり、NER の機能欠損が細胞増殖速度鈍化の原因の 1 つであることを示唆している。

5.3.8 NER の機能欠損は転写産物量の変化の原因ではない

次に変異型 RPB6 発現細胞で見られた NER の機能欠損が、同細胞で見られた転写反応の変化に関与しているのか明らかにするため、NAC を処理した条件での転写産物量を調べた。その結果、F8A/F13A-RPB6 発現細胞で見られた転写産物量の変化が NAC の処理によって改善するという、明確な結果は得られなかった (図 5-5)。つまり、ROS によるダメージの蓄積は変異型 RPB6 発現細胞で見られた転写反応の変化の原因ではないと考えられる。この結果は、NER の機能欠損が転写反応の変化の原因ではないことを示唆している。

5.4 本章のまとめ

RPB6-TFIIH の相互作用の機能的意義を明らかにするため、野生型 RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞を用いた表現型の比較解析を行ってきた。その結果、変異型 RPB6 発現細胞では、細胞増殖速度の鈍化 (2 章) と、RNAPI と RNAPII、RNAPIII の転写反応の変化 (3 章)、NER の機能欠損 (4 章) の 3 つの表現型の変化が検出された。本章ではこれら 3 つの表現型の因果関係について調べた。その結果、RNAPII と RNAPIII の転写産物量の減少と、NER の機能欠損による ROS ダメージの蓄積が細胞増殖速度の鈍化の一因であることが分かった。また、全 RNAP の転写反応の変化と NER の機能欠損は互いに影響しあわないことも分かった (図 5-6)。これらの結果から、RPB6-TFIIH の相互作用が失われると、全 RNAP の転写反応の変化と NER の機能欠損が独立して起こり、その結果として細胞増殖速度の鈍化が起こるといふ表現型同士の因果関係を明らかにすることが出来た。

5.5 図表

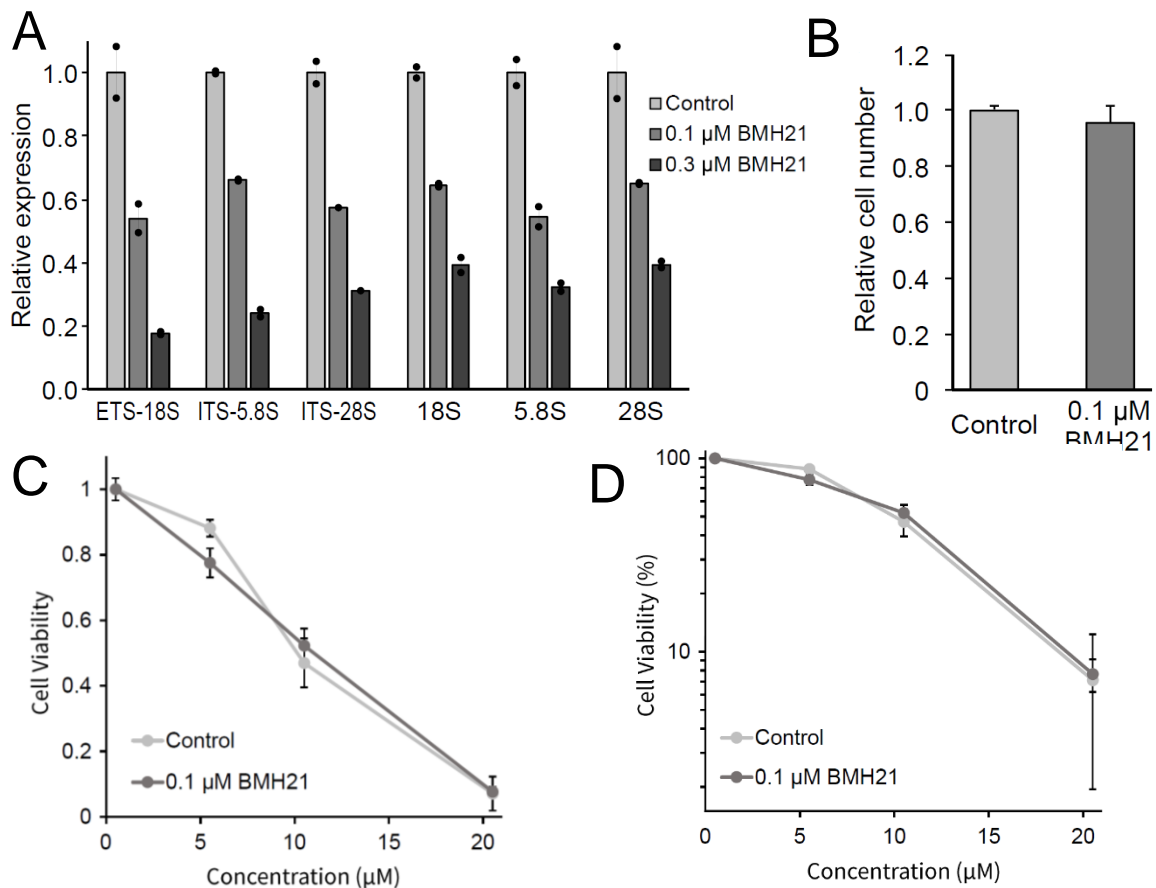


図 5-1 RNAPI 阻害下における細胞増殖と NER

(A) RNAPI 阻害剤である BMH-21 存在下または非存在下で 96 時間培養した WT-RPB6 発現細胞における、RNAPI の転写産物量を定量 RT-PCR を用いて解析した。発現量は BMH-21 非存在下で培養した細胞の発現量をもとに正規化している。グラフには平均値と個々のデータポイント (n=2) を示した。(B) BMH-21 存在下または非存在下で同じ細胞数から 96 時間培養した WT-RPB6 発現細胞の相対細胞数を示した。細胞数は BMH-21 非存在下で培養した細胞の数をもとに正規化している。また、エラーバーは標準偏差 (n=3) を表している。(C と D) RNAPI 阻害下でのシスプラチン耐性を調べたグラフ。あらかじめ BMH-21 存在下または非存在下で 96 時間以上培養した WT-RPB6 発現細胞に、シスプラチンを 72 時間処理した。細胞生存率はシスプラチンを処理していない細胞の数を基準に算出している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を表している。また、細胞生存率は線形スケール (C) と対数スケール (D) のそれぞれを用いて整理した。

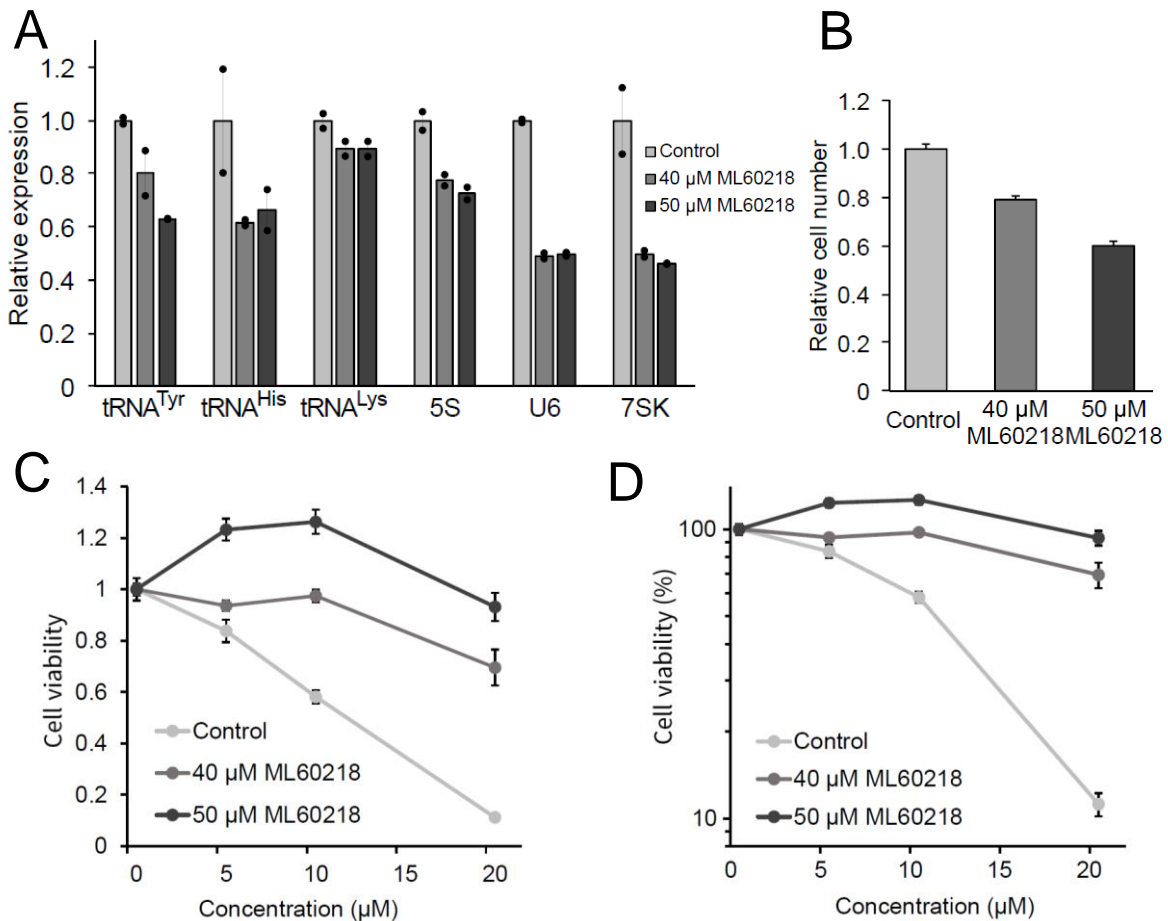


図 5-2 RNAPIII 阻害下における細胞増殖と NER

(A) RNAPIII 阻害剤である ML60218 存在下または非存在下で 72 時間培養した WT-RPB6 発現細胞における、RNAPIII の転写産物量を定量 RT-PCR を用いて解析した。発現量は ML60218 非存在下で培養した細胞の発現量をもとに正規化している。グラフには平均値と個々のデータポイント (n=2) を示した。(B) ML60218 存在下または非存在下で同じ細胞数から 96 時間培養した WT-RPB6 発現細胞の相対細胞数を示した。細胞数は ML60218 非存在下で培養した細胞の数をもとに正規化している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を表している。(C と D) RNAPI 阻害下でのシスプラチン耐性を調べたグラフ。あらかじめ ML60218 存在下または非存在下で 72 時間培養した WT-RPB6 発現細胞に、シスプラチンを 72 時間処理した。細胞生存率はシスプラチンを処理していない細胞の数を基準に算出している。エラーバーは標準偏差 (n=3) を表している。また、細胞生存率は線形スケール (C) と対数スケール (D) のそれぞれを用いて整理した。

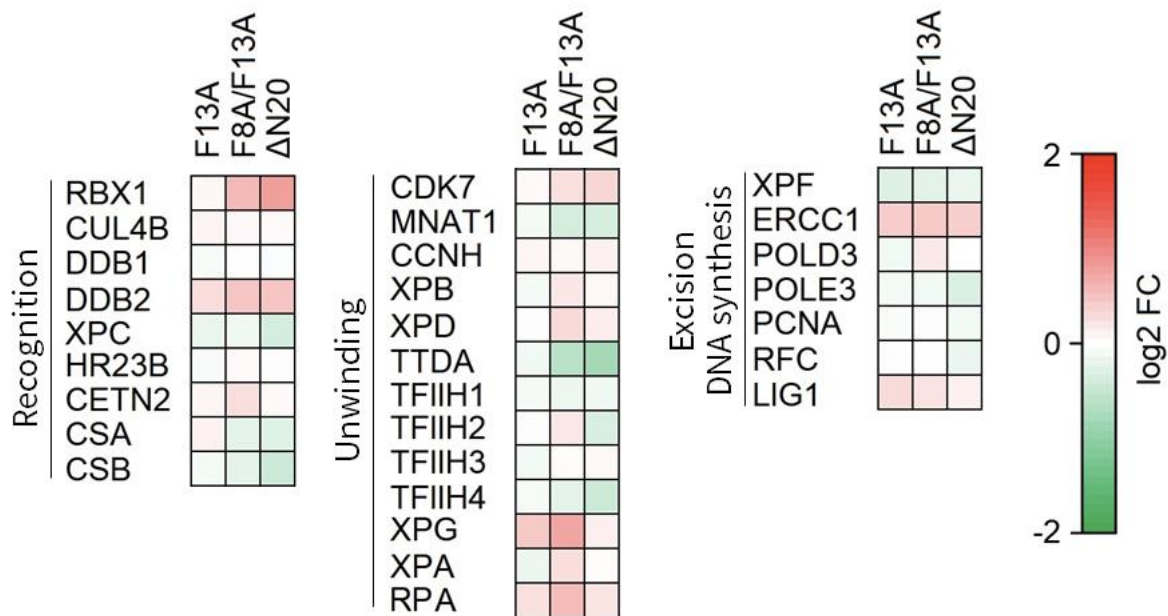
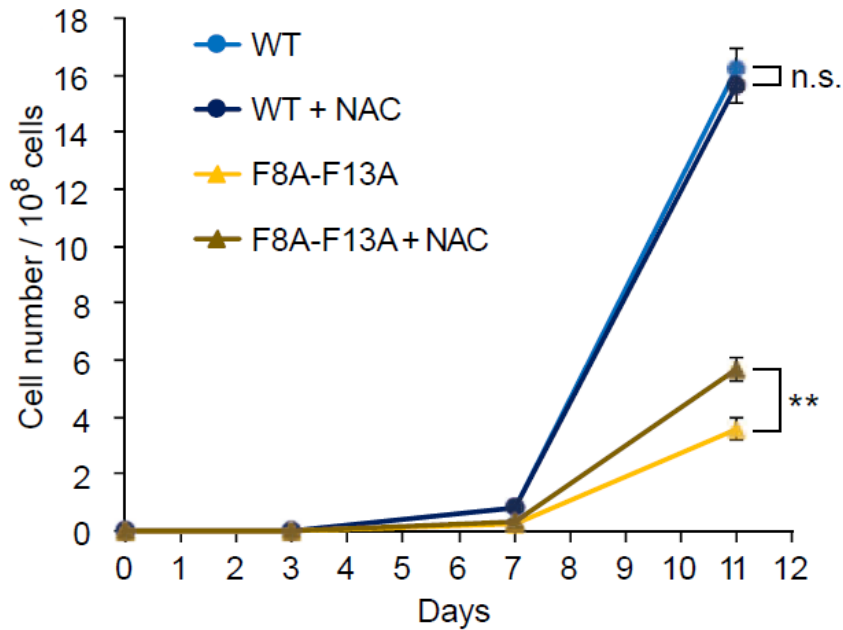


図 5-3 野生型及び変異型 RPB6 発現細胞における NER 関連遺伝子の発現量比較

WT-RPB6 発現細胞と変異型 RPB6 発現細胞における NER 関連遺伝子の発現量を比較したヒートマップを示した。NER 関連遺伝子の発現量の定量には RNA-seq を用いた。発現量の倍率変化は増加を赤で、減少を緑で表現した。KEGG Pathway において Nucleotide excision repair (map03420) に分類されている遺伝子を NER 関連遺伝子として抽出し解析した。



	WT	WT	F8A-F13A	F8A-F13A
3 μ M NAC	-	+	-	+
Doubling time (h)	22.6	22.7	27.8	26.0

図 5-4 ROS 除去下での WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の増殖曲線

NAC 存在下または非存在下で 1 週間以上培養した WT-RPB6 発現細胞及び F8A/F13A-RPB6 発現細胞の増殖曲線を示した。それぞれ同じ細胞数から培養を開始し、培養 3 日目と 7 日目、11 日目に細胞数を測定した。増殖曲線から算出された倍加時間を増殖曲線の下に示した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、**は $p < 0.01$ (two-tailed Student's t-test) を、n.s.は有意差が存在しなかったことを表している。

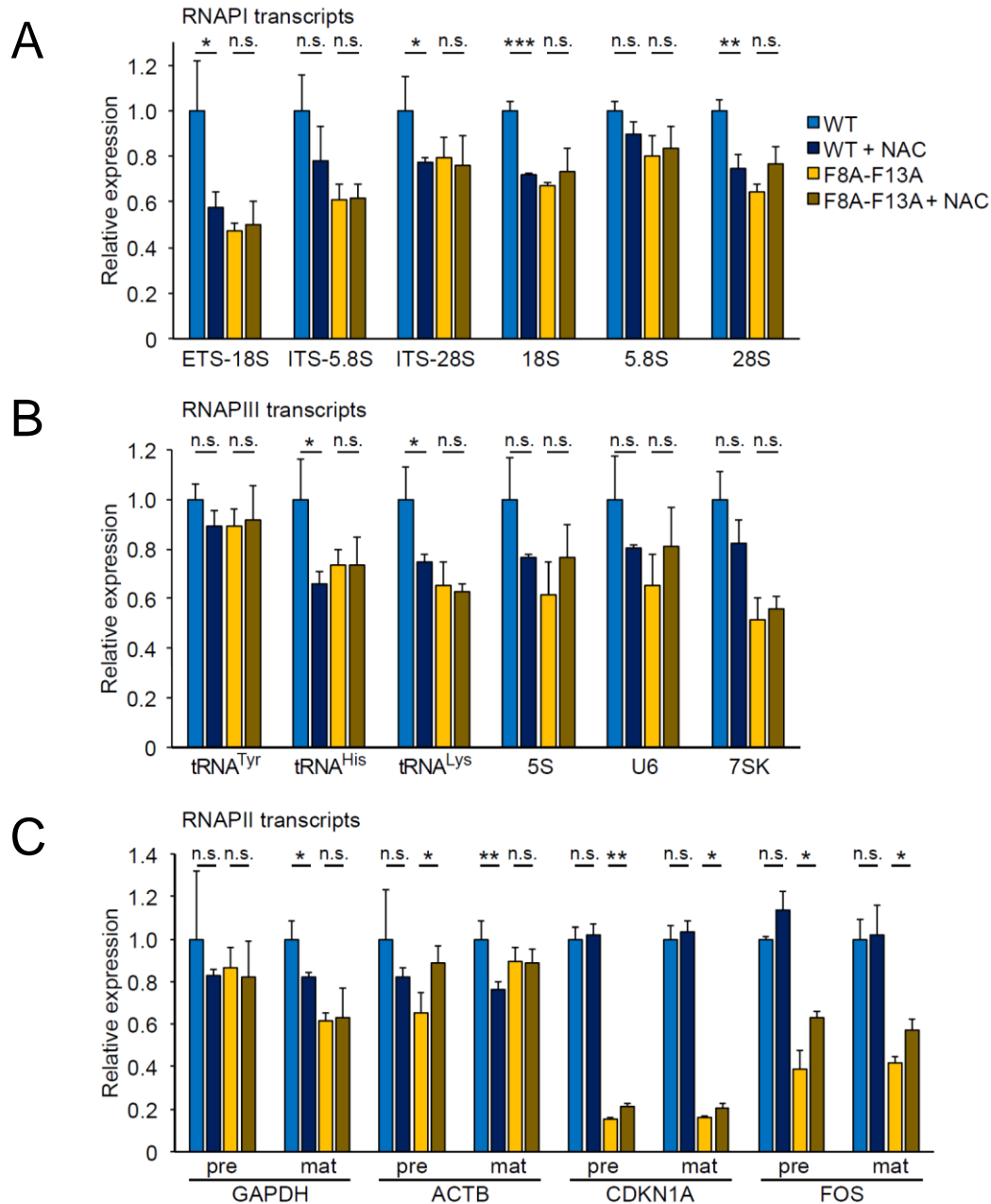


図 5-5 ROS 除去下での WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞の転写産物量

NAC 存在下または非存在下で 1 週間以上培養した WT-RPB6 発現細胞と F8A/F13A-RPB6 発現細胞における転写産物量の比較結果を示した。RNAPI (A) と、RNAPII (B)、RNAPIII (C) が転写を担う遺伝子の発現量を定量 RT-PCR を用いて解析した。エラーバーは標準偏差 (n=3) を、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ (two-tailed Student's t-test) を、n.s.は有意差が存在しなかったことを表している。

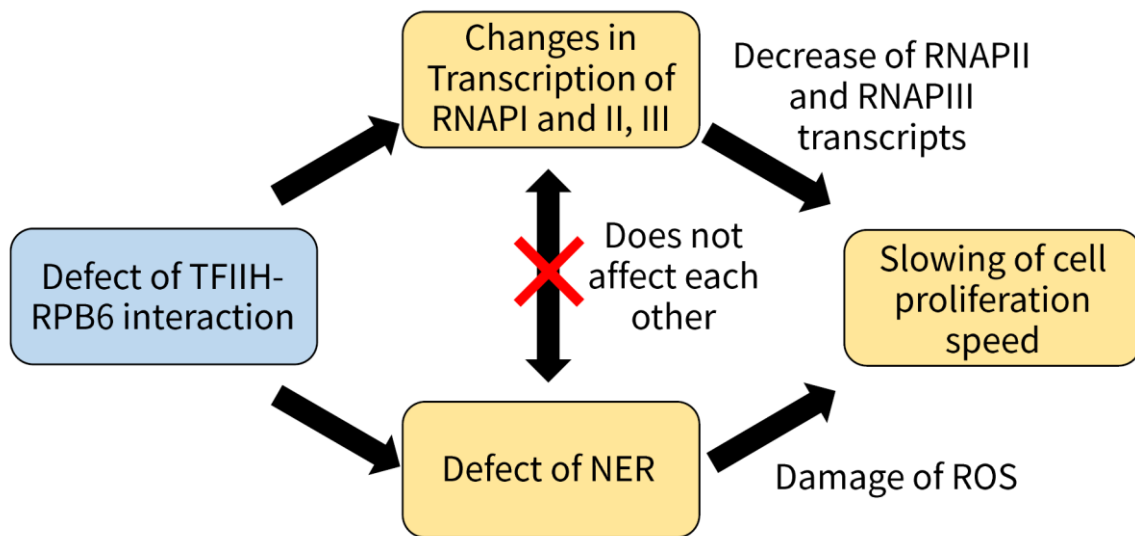


図 5-6 変異型 RPB6 発現細胞で観察された表現型の変化の相関関係

変異型 RPB6 発現細胞では、細胞増殖速度の鈍化と全 RNAP の転写反応の変化、NER の機能欠損の 3 つの表現型の変化が見られた。これらの表現型が独立して起こっているのか、それともいずれかの表現型に由来する表現型なのか調べた実験の結果を整理した。

第 6 章 まとめと考察

6.1 結果まとめ

本研究では、全 RNAP に共通するサブユニットである RPB6 と、基本転写因子であり NER においても重要な因子である TFIIH の相互作用に注目し研究を行った。RPB6-TFIIH の相互作用の構造と機能的意義を明らかにするため、TFIIH との結合能を欠損する変異型 RPB6 を用いた遺伝学的解析を行った。その結果、RPB6 と TFIIH の相互作用には、RPB6 の天然変性領域に存在する 13 番目と 8 番目のフェニルアラニンが重要であることが分かった。さらに、RPB6 と TFIIH の相互作用は細胞の増殖と、すべての RNAP (RNAPI、RNAPII、RNAPIII) の転写反応、そして RNAPI と RNAPII の転写共役型 NER に重要であることも明らかになった。また細胞の増殖については、RPB6-TFIIH の相互作用による RNAPII と RNAPIII の転写反応と NER への関与がそれぞれ部分的に影響していることも分かった。つまり、RPB6 の天然変性領域と TFIIH-p62 PH-D の結合を介して全 RNAP と TFIIH は相互作用しており、この相互作用は RNAP が機能する上で非常に重要な要素であることが分かった (図 6-1)。

6.2 RPB6 の天然変性領域に相互作用する TFIIH 以外の因子

本研究では RPB6 の天然変性領域に存在する 8 番目と 13 番目の phe を Ala に置換することで、TFIIH との結合能を失わせ、表現型の変化を起こさせた。変化が観察された表現型 (細胞増殖、転写反応、転写共役型 NER) が、RPB6-TFIIH の相互作用が関与する機能であると考えられる。しかし、RPB6 の天然変性領域に入れたこれらの変異が、RPB6 の天然変性領域に対する TFIIH 以外の未知の相互作用因子に影響している可能性も考えられなくはない。RPB6 の天然変性領域に関する研究はほとんど行われておらず、今のところ TFIIH 以外の相互作用因子は見つかっていない。RPB6 の天然変性領域の相互作用因子の探索は、RNAP による転写反応の分子メカニズムの解明につながる重要なテーマであると考えられる。

RPB6 の天然変性領域に相互作用する因子の同定には、本研究で作製した野生型 RPB6 及び変異型 RPB6 を用いた共免疫沈降実験が考えられる。しかし、本研究で使用した変異型 RPB6 発現細胞では多くの遺伝子の発現量が変化しており、天然変性領域の相互作用因子の解析には不適切であり使用することができない。そこで例えば、大腸菌で発現させた野生型 RPB6 及び変異型 RPB6 を精製した後に、HeLa 細胞のライセートと混合する。その後、野生型 RPB6 及び変異型 RPB6 を免疫沈降することで、RPB6 の天然変性領域に相互作用する因子を共精製することができる。WT-RPB6 によって共沈降してきたタンパク質と Δ N20-RPB6 によって共沈降してきたタンパク質を比較することで、天然変性領域の相互作用因子を同定することができる。また、WT-RPB6 によって共沈降してきたタンパク質と F8A/F13A-RPB6 によって共沈降してきたタンパク質を比較することで、本研究で観察された表現型の変化に関与する可能性がある天然変性領域の相互作用因子を同定することができる。

6.3 RPB6-TFIIH の相互作用の転写に果たす役割

本研究の結果から、RPB6-TFIIH の相互作用は RNAPI と RNAPII、RNAPIII の転写反応に、それぞれ関与していることが明らかになった。しかし、一般的に TFIIH は RNAPII の転写開始に関与する因子であると考えられている [8]。RNAPI の転写反応に TFIIH が関与しているという報告は複数存在するが、いつどこで、どのような相互作用を介して関与しているのかなどの、分子レベルでの証拠は存在しない [26,27]。また、RNAPIII の転写反応に TFIIH が関与しているという報告は、そもそも存在しない。本研究の結果は TFIIH が RPB6 を介して RNAPI と RNAPIII の転写反応に関与していることを示唆しており、RNAPI と RNAPIII の転写反応そのものに関する研究を前進させるものであると言える。

また、RNAPII の転写開始において、TFIIH は TFIIE の α サブユニットと相互作用することがすでに分かっている [8]。つまり、転写開始の段階で RPB6 と TFIIH が相互作用している可能性は低い。さらに、TFIIH が RNAPII の転写伸長に関与している可能性を示唆する報告も存在する [28]。本研究の結果は、TFIIH が RNAPII の転写伸長に関与している可能性を強め、その関与に TFIIH と RPB6 の相互作用が重要であることを明らかにした。また、転写伸長中の RNAPII と TFIIH が相互作用している構造のモデルによれば、RNAPII のサブユニットである RPB1 の CTD と TFIIH が隣接している [19]。TFIIH は CTD のリン酸化活性をもつサブユニットを有しており [7]、CTD のリン酸化は転写反応の制御に非常に重要であることが分かっている [4]。これらの知見から、TFIIH は RPB6 を介して転写伸長中の RNAPII と相互作用し、RPB1 の CTD のリン酸化を行うことで RNAPII の転写反応を制御するという仮説を立てることができる。

6.4 RPB6-TFIIH の相互作用の転写共役型 NER に果たす役割

6.4.1 RNAPI と RNAPIII における転写共役型 NER の存在可能性

本研究の結果から RPB6-TFIIH の相互作用は、RNAPI と RNAPII の転写共役型 NER に関与していることが明らかになった。しかし、そもそも転写共役型 NER は RNAPII の転写反応においてのみ起こる現象であると考えられており [10]、RNAPI においても起こるのかは議論がなされている段階である [29,30]。本研究の結果は、RNAPI における転写共役型 NER の存在を裏付けるものであり、またそのメカニズムに RPB6-TFIIH の相互作用が関与していることを明らかにした。

また、RNAPI や RNAPII と同様に RPB6 を介して TFIIH と相互作用する RNAPIII にも転写共役型 NER が存在する可能性がある。しかし、本研究ではそもそも RNAPIII が転写を担う遺伝子に、RRS を検出するに足る損傷を入れることができなかった (図 4-6)。これは RNAPIII が転写を担っている遺伝子の長さが、RNAPI と RNAPII の遺伝子に比べて短いことが原因であると考えられる。長さが短い遺伝子にはそもそも変異が入りづらく、仮に変異が入ったとしても、その転写共役型 NER 活性を検出することは難しい。つまり、損傷が入りづらい RNAPIII が転写を担う遺伝子の転写共役型 NER 活性の検出は難しく、そもそも RNAPIII には転写共役型 NER が必要ない可能性もある。これまで、RNAPIII における転写共役型 NER の存在を報告した論文は存在しない。

6.4.2 RPB6-TFIIH の相互作用の転写共役型 NER への関与モデル

RPB6-TFIIH の相互作用が転写共役型 NER に関与していることは分かったが、いつどこでその相互作用が起こるのか分かっていない。先行研究において、転写共役型 NER に関与する因子である UVSSA が TFIIH-p62 PH-D と相互作用するという報告がある [14]。また、UVSSA の 414 番目のリジンのモノユビキチン化が、UVSSA の脱離と転写共役型 NER に重要であるという報告もある [31]。本研究結果とこれらの報告を組み合わせ、RPB6 と TFIIH の相互作用が転写共役型 NER に関与するモデルを立てた (図 6-2)。そのモデルでは RNAPII が DNA 損傷で一時停止した後、UVSSA がその天然変性領域を p62 PH-D と相互作用させ、TFIIH を損傷部位ヘリクルートしてくる。その後、UVSSA の天然変性領域に存在する 414 番目のリジンのモノユビキチン化をきっかけに TFIIH が RPB6 へと受け渡され、その後の

転写共役型 NER のステップに進んでいく。UVSSA の変異体と RPB6 の変異体を用いた、遺伝学的解析 (TFIIH の損傷部位へのリクルートや、転写共役型 NER 活性の比較など) を行えば、本研究で立てたモデルの検証と、不明瞭であった TFIIH のリクルートの分子メカニズムを明らかにすることができる。

6.4.3 脊椎動物以外の種における RPB6-TFIIH の相互作用と転写共役型 NER

RPB6 の天然変性領域以外のアミノ酸配列は、真核生物の間で非常に高度に保存されているが、天然変性領域の保存度はそれほど高くない (図 1-3)。例えば、脊椎動物では RPB6 の天然変性領域の配列がほぼ完全に保存されているが、節足動物であるショウジョウバエの天然変性領域の配列は、脊椎動物のものとはわずかに類似点を見出せる程度である。さらに線形動物である線虫や菌類である分裂酵母では、ほとんど類似点を見出すことができない。つまり、本研究で明らかになった RPB6 と TFIIH の相互作用は、脊椎動物以外では起こらない可能性がある。しかし、CSA と CSB、UVSSA を欠損したショウジョウバエにおいて、転写共役型 NER が起こっているという報告がある [32]。脊椎動物の転写共役型 NER にとって UVSSA は必須の因子であり、UVSSA がないと転写共役型 NER は起こらない [30]。よってショウジョウバエでは、RPB6 と TFIIH が相互作用し UVSSA の機能を代替している可能性が考えられる。また一方で、線虫では UVSSA のホモログである *uvs-1* が転写共役型 NER に重要であるという報告もある [33]。このように、UVSSA の天然変性領域と RPB6 の天然変性領域が転写共役型 NER に両方とも必須である種と、RPB6 の重要度が高い種、UVSSA の重要度が高い種が存在している。TFIIH との相互作用能を有した RPB6 の天然変性領域がいつ進化的に獲得され、どんな意味があるのかについて研究することは生物学的に重要なテーマであると考えられる。

6.5 図表

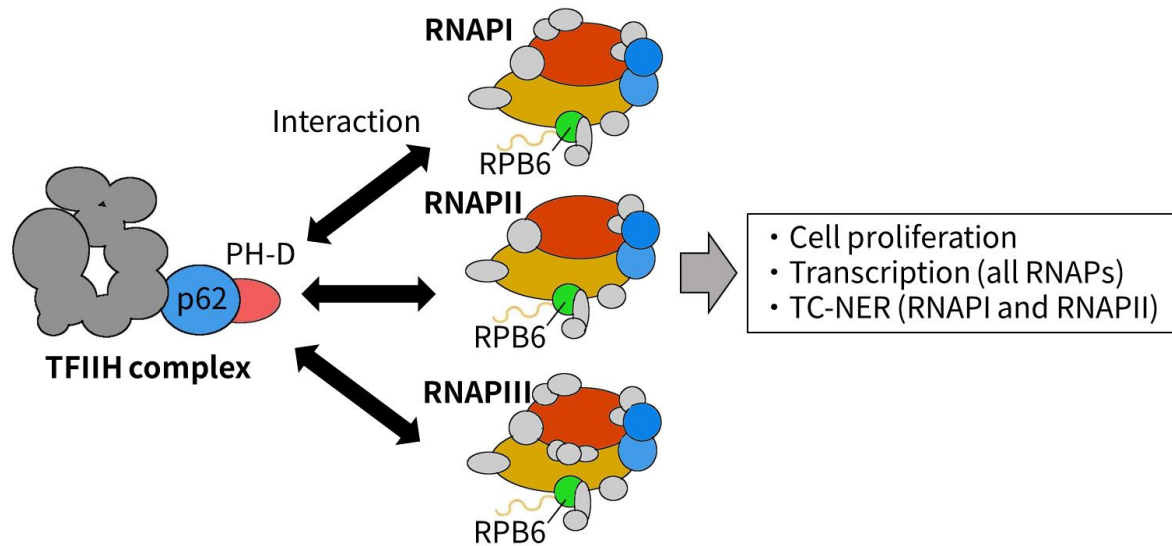


図 6-1 p62 PH-D と RPB6 の結合を介した、TFIID-RNAPs の相互作用とその機能

p62 PH-D と RPB6 の天然変性領域の結合を介した、TFIID と 3 つの RNAP (RNAPI、RNAPII、RNAPIII) の相互作用の模式図。TFIID-RNAPs の相互作用は細胞増殖と全 RNAP の転写反応、RNAPI と RNAPII の転写共役型 NER に重要な役割を果たしていた。

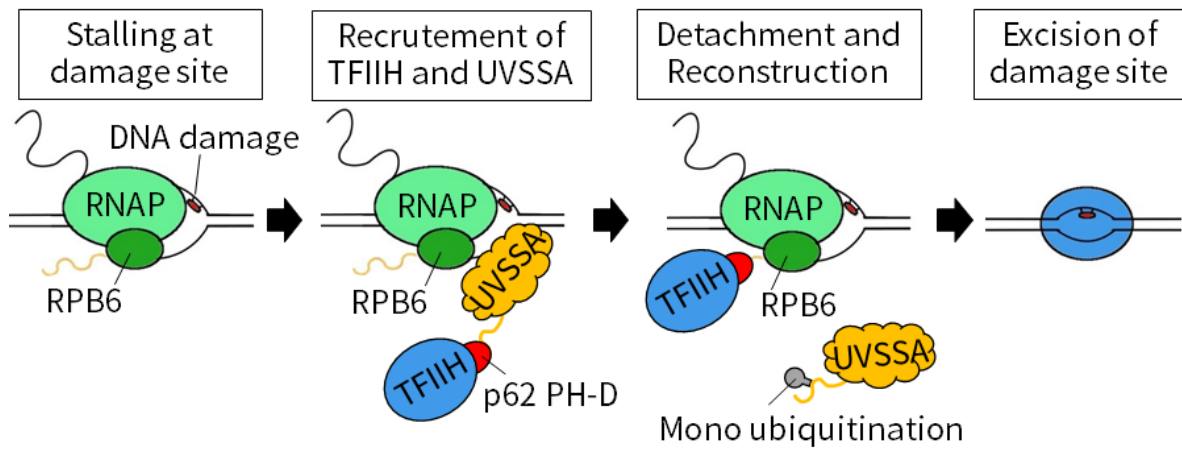


図 6-2 RPB6-TFIIH の相互作用の転写共役型 NER への関与のモデル

RPB6-TFIIH の相互作用が、転写共役型 NER に関与するモデルを示した。転写共役型 NER は転写伸長中の RNAP が DNA 損傷で一時停止するところから始まる。損傷で一時停止した RNAP に向かって、UVSSA がその天然変性領域を TFIIH-p62 PH-D と相互作用させ、TFIIH をリクルートしてくる。その後、UVSSA の天然変性領域に存在する 414 番目のリジンのモノユビキチン化を合図に TFIIH が UVSSA から脱離し、RPB6 の天然変性領域と相互作用する。TFIIH が DNA 損傷部位で保持され、その後の転写共役型 NER の以降のステップが進行していく。

参考文献

- [1] Abel,C.-B., Verónica,M.-F., Ana I,G.-G. and Francisco,N. (2017) Subunits common to RNA polymerases. *The Yeast Role in Medical Applications* 1, 151-165.
- [2] He,Y., Yan,C., Fang,J., Inouye,C., Tjian,R., Ivanov,I. and Nogales,E. (2016) Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening. *Nature* 533, 359–365.
- [3] Harlen,K.M. and Churchman,L.S. (2017) The code and beyond: transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 263–273.
- [4] Chapman,R.D., Heidemann,M., Hintermair,C. and Eick,D. (2008) Molecular evolution of the RNA polymerase II CTD. *Trends Genet.* 24, 289–296.
- [5] Cramer,P., Bushnell,D.A., Fu,J., Gnatt,A.L., Maier-Davis,B., Thompson,N.E., Burgess,R.R., Edwards,A.M., David,P.R. and Kornberg,R.D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640–649.
- [6] Nouraini, S., Archambault, J. and Friesen, J. D. (1996) Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. *Mol. Cell Biol.* 16 5985–5996.
- [7] Compe,E. and Egly,J.M. (2016) Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIH and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 265–290.
- [8] Rengachari,S., Schilbach,S., Aibara,S., Dienemann,C., Cramer,P. (2021) Structure of the human Mediator–RNA polymerase II pre-initiation complex. *Nature* 594, 129–133.
- [9] Okuda,M., Tanaka,A., Satoh,M., Mizuta,S., Takazawa,M., Ohkuma,Y. and Nishimura,Y. (2008) Structural insight into the TFIIIE-TFIIH interaction: TFIIIE and p53 share the binding region on TFIIH. *EMBO J.* 27, 1161–1171.
- [10] Tapias,A., Auriol,J., Forget,D., Enzlin,J.H., Schärer,O.D., Coin,F., Coulombe,B. and Egly,J.M. (2004) Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J. Biol. Chem.* 279, 19074–19083.
- [11] de Laat,W.L., Jaspers,N.G. and Hoeijmakers,J.H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13, 768–785.
- [12] Foustieri,M. and Mullenders,L. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 18, 73–84.
- [13] Okuda,M., Kinoshita,M., Kakumu,E., Sugawara,K. and Nishimura,Y. (2015) Structural insight into the mechanism of TFIIH recognition by the acidic string of the nucleotide excision repair factor XPC. *Structure* 23, 1827–1837

- [14] Okuda,M., Nakazawa,Y., Guo,C., Ogi,T. and Nishimura,Y. (2017) Common TFIIH recruitment mechanism in global genome and transcription-coupled repair subpathways. *Nucleic Acids Res.* 45, 13043–13055.
- [15] Okuda,M., Ekimoto,T., Kurita,J., Ikeguchi,M. and Nishimura,Y. (2021) Structural and dynamical insights into the PH domain of p62 in human TFIIH. *Nucleic Acids Res.* 49, 2916–2930.
- [16] Lemmon,M.A. (2007) Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochemical Society symposium* 74, 81–93.
- [17] Okuda,M. and Nishimura,Y. (2014) Extended string binding mode of the phosphorylated transactivation domain of tumor suppressor p53. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 14143–14152.
- [18] Okuda,M., Araki,K., Ohtani,K. and Nishimura,Y. (2016) The interaction mode of the acidic region of the cell cycle transcription factor DP1 with TFIIH. *J. Mol. Biol.* 428, 4993–5006.
- [19] Okuda,M. Suwa,T. Suzuki,H. Yamaguchi,Y. and Nishimura,Y. (2021) Three human RNA polymerases interact with TFIIH via a common RPB6 subunit. *Nucleic Acids Res.*, gkab612.
- [20] Nakazawa,Y., Yamashita,S., Lehmann,A.R. and Ogi,T. (2010) A semi-automated non-radioactive system for measuring recovery of RNA synthesis and unscheduled DNA synthesis using ethynyluracil derivatives. *DNA Repair (Amst.)* 9, 506–516.
- [21] McQuin,C., Goodman,A., Chernyshev,V., Kametsky,L., Cimini,B.A., Karhohs,K.W., Doan,M., Ding,L., Rafelski,S.M., Thirstrup,D., Wiegraebe,W., Singh,S. Becker,T., Caicedo,J.C. and Carpenter,A.E. (2018) CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* 16, e2005970.
- [22] Peltonen,K., Colis,L., Liu,H., Trivedi,R., Moubarek,M.S., Moore,H.M., Bai,B., Rudek,M.A., Bieberich,C.J. and Laiho,M. (2014) A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer cell* 25, 77–90.
- [23] Wu,L., Pan,J., Thoroddsen,V., Wysong,D.R., Blackman,R.K., Bulawa,C.E., Gould,A.E., Ocain,T.D., Dick,L.R., Errada,P., Dorr,P.K., Parkinson,T., Wood,T., Kornitzer,D., Weissman,Z., Willis,I.M. and McGovern,K. (2003) Novel small-molecule inhibitors of RNA polymerase III. *Eukaryotic cell* 2, 256–264.
- [24] Lee,T.H. and Kang,T.H. (2019) DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6092.
- [25] Zafarullah,M., Li,W., Sylvester,J. and Ahmad,M. (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 6–20.

- [26] Hoogstraten,D., Nigg,A.L., Heath,H., Mullenders,L.H., van Driel,R., Hoeijmakers,J.H., Vermeulen,W. and Houtsmuller,A.B. (2002) Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Molecular cell* 10, 1163–1174.
- [27] Assfalg,R., Lebedev,A., Gonzalez,O.G., Schelling,A., Koch,S. and Iben,S. (2012) TFIIH is an elongation factor of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* 40, 650–659.
- [28] Narita,T., Narita,K., Takedachi,A., Saijo,M. and Tanaka,K. (2015) Regulation of Transcription Elongation by the XPG-TFIIH Complex Is Implicated in Cockayne Syndrome. *Mol. Cell. Biol.* 35, 3178–3188.
- [29] Daniel,L., Cerutti,E., Donnio,L.M., Nonnekens,J., Carrat,C., Zahova,S., Mari,P.O. and Giglia-Mari,G. (2018) Mechanistic insights in transcription-coupled nucleotide excision repair of ribosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E6770–E6779.
- [30] Yang,Y., Hu,J., Selby,C.P., Li,W., Yimit,A., Jiang,Y. and Sancar,A. (2019) Single-nucleotide resolution analysis of nucleotide excision repair of ribosomal DNA in humans and mice. *J. Biol. Chem.* 294, 210–217.
- [31] Nakazawa,Y., Hara,Y., Oka,Y., Komine,O., van den Heuvel,D., Guo,C., Daigaku,Y., Isono,M., He,Y., Shimada,M. et al. (2020) Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII promotes Transcription-Coupled repair. *Cell* 180, 1228–1244.
- [32] Dceger,N., Yang,Y., Lindsey-Boltz,L.A., Sancar,A. and Selby,C.P. (2019) *Drosophila*, which lacks canonical transcription-coupled repair proteins, performs transcription-coupled repair. *J. Biol. Chem.* 294, 18092–18098.
- [33] Babu,V. and Schumacher,B. (2016) A *C. elegans* homolog for the UV-hypersensitivity syndrome disease gene UVSSA. *DNA repair* 41, 8–15.

※本論文の図1-7、図2-3、図2-4A、図2-5、図3-1、図3-2、図3-3、図3-4、図4-1AとC、図4-2AとC、図4-3、図4-4、図4-5、図4-6、図5-1、図5-2、図5-3、図5-4、図5-5はオックスフォード大学出版局によって発行された*Nucleic Acids Research*に掲載された自身の論文 [19] から引用している。

謝辞

本研究に際し、御指導を賜りました東京工業大学山口雄輝教授に篤くお礼申し上げます。また、本研究の共同研究先として、TFIIH-RPB6の相互作用の構造解析を担当してくださった横浜市立大学生命医科学研究科プロジェクト研究室の西村善文教授と奥田昌彦特任准教授に心から感謝致します。また、東工大所属時に野生型及び変異型RPB6発現細胞の作製にご協力頂きました横浜市立大学医学研究科分子生物学教室鈴木秀文助教に深く感謝致します。また、本研究を行うにあたり、様々な実験試料を御分与頂いた、あるいは有意義な討論をしてくださった山口研究室の皆様に感謝致します。最後に、常に温かく見守り、また支えとなってくれた家族に心から感謝致します。