

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 （理学） Doctor of
学生氏名： Student's Name	諏訪 哲史		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	山口 雄輝
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

真核生物には、3 種類の RNA ポリメラーゼ (RNAPI、RNAPII、RNAPIII) が存在し、それぞれ異なる種類の RNA を転写している。RNAPI は rRNA を、RNAPII は mRNA と多くの snRNA を、RNAPIII は tRNA とその他の小分子 RNA を転写している。RNAPII の固有サブユニットである RPB1 の C 末端に天然変性領域が存在することは有名だが、全 RNAP に共通するサブユニットの 1 つである RPB6 にも、その N 末端に天然変性領域が存在する。世界中で RNAP に関する研究が盛んに行われているが、RPB6 の天然変性領域の機能はこれまで明らかになっていなかった。本研究において私は、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 が、そのサブユニットである p62 の Pleckstrin homology ドメイン (PH-D) を介して、RPB6 の天然変性領域と相互作用することを明らかにした。p62 の PH-D は基本転写因子 TFIIIE の α サブユニットや紫外線高感受性症候群の原因遺伝子 UVSSA などの天然変性領域と相互作用することで、TFIIH の多機能性を支えていることが分かってきている。本研究では RPB6 の天然変性領域と TFIIH-p62 PH-D の相互作用の、機能的意義の解明を目的とした。

本研究では TFIIH-RPB6 の相互作用の機能的意義を明らかにするため、TFIIH との結合能が低下もしくは欠損した 3 種類の変異型 RPB6 (F13A、F8A/F13A、 Δ N20) を用いた、遺伝学的解析を行った。F13A は TFIIH との結合能が低下しており、F8A/F13A と Δ N20 は TFIIH と結合しないことが分かっている。これら 3 つの変異型 RPB6 または、野生型 (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 4 つの細胞の表現型を比較することで、TFIIH-RPB6 の相互作用がもつ機能的意義の解明を試みた。まず、これらの細胞の増殖速度を調べたところ、F8A/F13A 発現細胞ならびに Δ N20 発現細胞の増殖速度は WT 発現細胞と比べ、著しく低下していた。この結果は、TFIIH と RPB6 の相互作用が細胞増殖に重要であることを示している。

RPB6 は全 RNAP に含まれているので、TFIIH-RPB6 の相互作用は転写反応に関与している可能性がある。そこで野生型及び変異型 RPB6 発現細胞における RNAPI、II、III の転写産物量を定量し調べた。その結果、F8A/F13A 発現細胞ならびに Δ N20 発現細胞では、WT 発現細胞に比べて RNAPI 及び RNAPIII の転写産物量が 20～50%程度低下していた。また、RNAPII の転写産物を RNA-seq を用いて定量したところ、F8A/F13A 発現細胞ならびに Δ N20 発現細胞では 1500 を超える遺伝子の発現量が、WT 発現細胞に比べて変化していた。これらの結果は、TFIIH-RPB6 の相互作用が、全 RNAP の転写反応に関与していることを示唆している。

また、TFIIH は NER に必須の因子であるので、TFIIH-RPB6 の相互作用は NER に関与している可能性がある。そこで、野生型及び変異型 RPB6 発現細胞における NER を比較することにした。まず、NER で修復される損傷を引き起こす紫外線と白金錯体シスプラチンに対する感受性を比較したところ、F8A/F13A 発現細胞ならびに Δ N20 発現細胞は、WT 発現細胞に比べて高い感受性を示した。つまり、TFIIH-RPB6 の相互作用は NER に関与していると考えられる。しかし、NER には全ゲノム NER (GG-NER) と転写共役型 NER (TC-NER) の 2 つの経路が存在するため、TFIIH-RPB6 の相互作用がどちらの経路に関与しているのか判断がつかない。そこで次にその切り分けを試みた。WT 発現細胞と F8A/F13A 発現細胞における GG-NER 活性と TC-NER 活性をそれぞれ調べたところ、GG-NER 活性にはほとんど差がなかったが、WT 発現細胞に比べて F8A/F13A 発現細胞の TC-NER 活性が著しく低いことが分かった。さらに、TC-NER 活性を遺伝子ごとに区別して定量したところ、RNAPI と RNAPII が転写を担う遺伝子の TC-NER 活性のみが低下していた。これらの結果は、TFIIH-RPB6 の相互作用が RNAPI と RNAPII の TC-NER に関与していることを示唆している。

本研究によって TFIIH-RPB6 の相互作用は細胞増殖と、全 RNAP の転写反応、RNAPI と RNAPII の TC-NER に関与していることが分かった。これらの結果は、RPB6 の天然変性領域と TFIIH-p62 PH-D の相互作用が TFIIH のリクルートメントに重要であり、全 RNAP の様々な機能と密接に関連していることを示唆している。本研究は、なぜ全 RNAP が RPB6 を共通して有しているのかという、根本的な問に答え、転写と TC-NER に関するこれまでの研究を大きく前進させるものである。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	諏訪 哲史		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	山口 雄輝	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In eukaryotes, there are three types of RNA polymerases, RNAPI, RNAPII, and RNAPIII, each transcribing different types of RNA: RNAPI transcribes rRNA, RNAPII transcribes mRNA and most snRNAs, and RNAPIII transcribes tRNA and other small RNAs. It is well known that there is an intrinsically disordered region (IDR) at the C-terminus of RPB1, an RNAPII-specific subunit. In fact, RPB6, a subunit shared by all the RNAPs, also has an IDR at its N-terminus. Although RNAPs have been extensively studied, the function of the RPB6-IDR has not been clarified. My collaborators and I found that the pleckstrin homology domain (PH-D) of the p62 subunit of the general transcription/repair factor TFIIH interacts with the RPB6-IDR. The PH-D of p62 is considered to support the multifunctionality of TFIIH, as it interacts with several proteins such as the alpha subunit of TFIIIE, the causative gene product for xeroderma pigmentosum XPC, and the causative gene product for UV hypersensitivity syndrome UVSSA. Since my collaborators clarified the structural basis for the interaction between the RPB6-IDR and p62 PH-D by nuclear magnetic resonance, I sought to elucidate the functional significance of this interaction. I performed genetic analyses using point mutants of RPB6 and found that the 8th and 13th phenylalanines of RPB6 are important for the interaction between RPB6 and PH-D, and the interaction is important for cell proliferation, transcription of all RNAPs, and transcription-coupled nucleotide excision repair of RNAPI and RNAPII. These results suggest that the interaction between RPB6-IDR and TFIIH-p62 PH-D is important for TFIIH recruitment and is closely related to various functions of all RNAPs.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).