

課題番号 1

突然変異を決定するヒト TLS ポリメラーゼの結合タンパク質の同定と発がん・老化・免疫機能との関与

[1] 組織

代表者：横井 雅幸
(学習院大学理学部生命科学科)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
協力者：花岡 文雄
(学習院大学理学部生命科学科)

研究費：物件費 25 万円，旅費 0 円

[2] 研究経過

DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) は、紫外線で生じる主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) を単独で効率よく正確に乗り越えて DNA 合成を行える唯一の酵素であり、ヒト Pol η をコードする *POLH* 遺伝子の異常は、高発がん性の色素性乾皮症バリエーション群の原因となる。Pol η は CPD に対して高い正確性を示すのに対し、損傷のない DNA を鋳型とする他のヒト DNA ポリメラーゼに比べて 50-1,700 倍も誤った塩基を挿入する。したがって生体内での Pol η の機能は、厳密に制御されていると考えられる。ヒト Pol η は 713 アミノ酸からなるが、試験管内での TLS には 1-432 アミノ酸で十分であり、Pol η の C 末領域 (433-713 アミノ酸) は DNA 複製装置のアクセサリタンパク質やユビキチン、TLS ポリメラーゼの一つである Rev1 との結合を担うだけでなく、リン酸化あるいはユビキチン化を受ける部位や核移行シグナルなど、Pol η の働きを制御する領域・部位も存在している。

Pol η は、染色体複製が損傷部位で停滞する問題の解消に働くだけでなく、免疫グロブリン遺伝子の多様性獲得、染色体脆弱部位の複製、テロメア複製、相同組換え DNA 合成など多様かつ重要な生命事象に関わる。このような複数の事象において Pol η は、損傷に対する正確な DNA 合成、損傷のない鋳型に対する不正確な DNA 合成、さらには損傷のない鋳型に対する正確な合成を状況に応じて行うと考えられる。

このように高度な使い分けを可能にしている仕組みは、現在まで不明である。

本申請課題では Pol η の制御機構を解明する糸口を見出すため、ヒト Pol η の C 末領域に結合する因子を同定し、その機能を解析することを目指した。

研究活動状況の概要として、協力者である学習院大学理学部生命科学科の花岡文雄教授とは研究全体を俯瞰した議論を行い、東北大学加齢医学研究所の安井明教授および研究室のメンバーである菅野新一郎講師とは新規データに関する議論を主にメールや学会参加時に行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Pol η の C 末領域 (433-713 アミノ酸) を GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、グルタチオンセファロースへ吸着後に HeLa 細胞の核抽出液と混合して 0.3 M NaCl 条件下で結合する分子の探索を行った。その結果、既知の相互作用分子である DNA 複製装置のアクセサリタンパク質を含めて、新規に結合分子を同定できた。特に注目したのは、DNA 二重鎖切断 (DSB) の修復機構である相同組換えへの関与が報告されている脱ユビキチン酵素の一つである USP11 である。Pol η の C 末領域にはユビキチン化されるアミノ酸残基が含まれることから、USP11 がユビキチン化 Pol η の脱ユビキチン化を行う分子である可能性が考えられ、USP11 による Pol η の活性制御の存在を示唆する。また Pol η が相同組換えにおいて修復合成を担うことが報告されていることから、相同組換えでの Pol η の機能と USP11 との関係が非常に注目される (図1)。

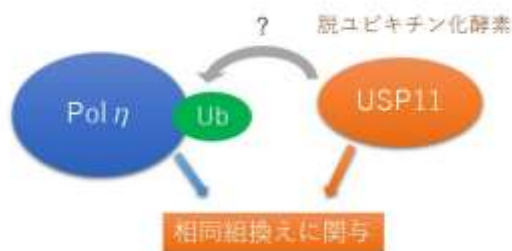


図1

現在、Pol η と USP11 を過剰発現した細胞で、両者の結合が免疫沈降により確認できている。今後は、1) 組換えタンパク質を用いた結合の詳細（直接的か間接的か、互いの結合部位）、2) 細胞内での相互作用と DNA 損傷との関係、3) USP11 と結合できない Pol η を発現する細胞の DNA 損傷への感受性について解析を進める予定である。

（3-2）波及効果と発展性など

本共同研究の成果として、Pol η という単一の DNA 合成酵素を異なる状況に対応するよう調節制御する機構の一端を明らかにできると考える。実際に得られた結合分子は、Pol η の関与が報告されている組換え修復に関わり、機能調節に直結する可能性の高い脱ユビキチン化活性を担うことから、当初の目的に沿う期待通りの結果であった。また本研究で用いた手法は他の分子でも応用が容易なことから、他の TLS ポリメラーゼの相互作用分子の同定と解析を進める予定である。そのようにして得られた TLS ポリメラーゼ結合分子の研究を発展させることで、発がん・老化・免疫機能での TLS ポリメラーゼの役割を明らかにできると期待する。

この共同研究を足掛かりとして、東北大学加齢医学研究所所属の安井明教授、菅野新一郎講師と新たな共同研究の企画が生まれた。また本共同研究課題以外でも意見交換をする機会に恵まれたことは、将来的な研究の発展に大きく寄与すると確信している。

[4] 成果資料

現時点で、研究成果は未発表である。