

課題番号 51

DNA 損傷乗り越え複製ポリメラーゼ Pol η の 免疫細胞での機能の解析

[1] 組織

代表者：花岡文雄

(学習院大学理学部)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

菅野新一郎 (東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 32 万 2 千円，旅費 0 円

[2] 研究経過

損傷乗り越え複製(translesion synthesis; TLS)は error prone な複製機構で、間違っただ塩基対を導入し変異をゲノムに固定してしまう働きがある。免疫系細胞では抗体可変領域で hypermutation を導入する機構に働いていると考えられるが、replicative DNA polymerase から TLS DNA polymerase へのエクステンシ機構制御や抗体可変領域にどのようにリクルートされてくるかなどよくわかっていない。そこで我々は Pol η をターゲットに特異的な相互作用タンパク質を同定するためバキュロ細胞を使った GST 融合組換えタンパク質を作成し、293 細胞及びマウス脾臓の核抽出液を用いて GST pull-down を行った。しかし、残念ながらほとんど結合するタンパク質を回収することができなかった。おそらく組換えタンパク質の 2 次・3 次構造が native な形をとっていないためだと思われる。

研究テーマについての議論は主にメールで行ない、国際会議で出会った時にだいたいの成果と研究方向についての討議を行なった。

[3] 成果

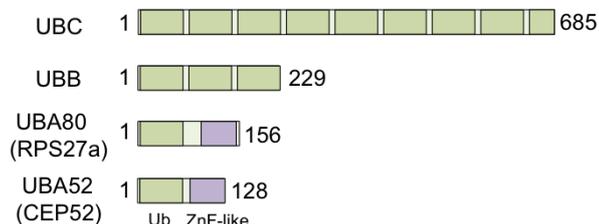
(3-1) 研究成果

TLS は通常の複製過程が DNA damage site でブロックされ、クランプタンパク質である PCNA が mono-ubiquitin 化されることによりポリメラーゼの交換が行われ進行する。Pol η は原核生物からヒトまで保存されているが、各生物種の Pol η を比較すると一部の生物は ubiquitin 結合モチーフを欠いてお

り、脊椎動物以前の生物は C 端側に 1 カ所、脊椎動物以降の生物は 2 カ所持っている。脊椎動物から高度な液性免疫を獲得することから、高等生物における ubiquitin 結合モチーフの追加が何らかの機能追加を反映している可能性があり、PCNA の mono-ubiquitin 化や Pol η の ubiquitin-PCNA の認識機構がどのように制御されているかを調べることにした。そこでまず、PCNA の mono-ubiquitin 化にどのような ubiquitin 前駆体が使われ、また、Pol η がその過程に影響をおよぼすのかを調べた。

Ubiquitylation に使われる ubiquitin はプロテアソームによるタンパク質分解過程で生じた ubiquitin の再利用か 4 種の前駆体を用いて行われる (Fig. 1)。

Fig.1



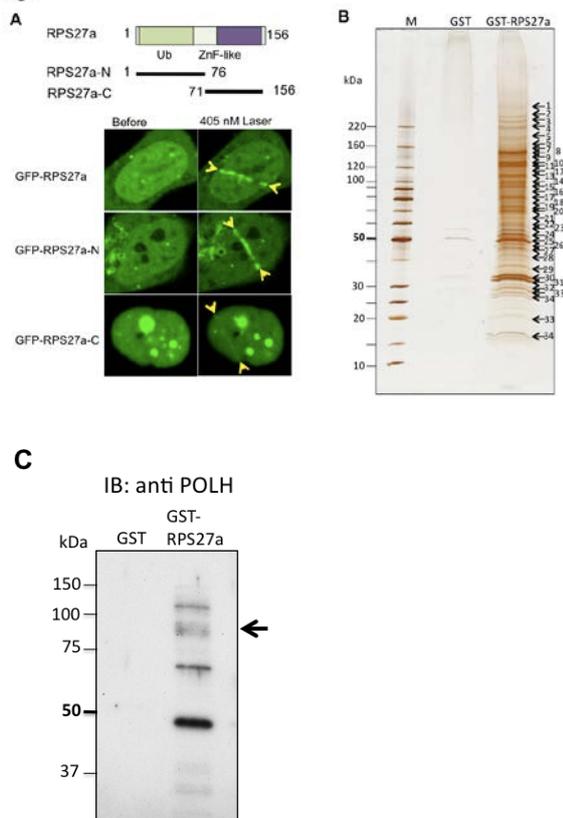
Ubiquitin 前駆体の UBC, UBB はそれぞれ 9 個、3 個の ubiquitin が連結したタンパク質だが、UBA52 (CEP52), UBA80 (RPS27a)は ubiquitin に Zinc finger-like なドメインが融合したタンパク質で、このドメインを介して DNA damage site を認識し、他のタンパク質と相互作用する可能性がある。そこで GFP-RPS27a を作成し U2OS 細胞に発現させ、405 nm のレーザーを用いて DNA 損傷部位に集積するかどうかを調べた。その結果、GFP-RPS27a は DNA double strand break や塩基修飾を起こすようなレーザー条件で DNA 損傷部位に集積することがわかった。この集積は特徴的で強く集積する部位と集積しない部位にわかれ、クロマチンの状態に依存していた。また、deletion mutant を使った実験で N 端側の ubiquitin が強く集積し、C 端側の ZnF-like なドメインは弱く集積することがわかった (Fig. 2A)。RPS27a が DNA 損傷部位

に集積することから GST 融合組換えタンパク質を作成し GST pull-down を行い、nanoLC/MS/MS を用いて結合タンパク質を解析した (Fig. 2B)。その結果、SWI/SNF, B-WICH などのクロマチンリモデリングファクター、ヘテロクロマチン関連タンパク質、DNA トポイソメラーゼや DNA リガーゼなど DNA 複製や修復関連のタンパク質が主要な相互作用タンパク質として同定された。また、相互作用タンパク質に Polη が含まれているかどうかを調べるため、ウエスタンブロットと抗 Polη 抗体で確認したところ Polη が結合していることが明らかになった (Fig. 2C)。

いく予定である。

[4] 成果資料
論文は準備中である。

Fig.2



(3-2) 波及効果と発展性など

RPS27a が ubiquitin 前駆体としての機能以外に DNA 複製・修復に関わっていることが GST pull-down を用いたプロテオーム解析で明らかになった。プロテオーム解析から、RPS27a には UV で活性化され G1/S, G2/M チェックポイントを誘導する MAPKAPK2 (MK2) や HP1 をリン酸化しヘテロクロマチンから遊離させる JAK2 などのプロテインキナーゼも結合しており、RPS27a が積極的に DNA damage response に関わっていることが示唆された。今後 RPS27a (及び UBA52) が複製や TLS にどのように関わっているのかを詳細に明らかにして