

課題番号 48

上皮系皮膚がんと間葉系皮膚繊維肉腫の紫外線による発症を異なる DNA ポリメラーゼが抑制するメカニズムの研究

[1] 組織

代表者：横井 雅幸
(神戸大学
バイオシグナル総合研究センター)

対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費30万円

[2] 研究経過

皮膚は、紫外線をはじめとする環境由来の因子による DNA 損傷を最も受けやすい組織の一つと言える。本研究は、皮膚組織での紫外線損傷による複製フォーク進行阻害への対抗機構として、異なる皮膚組織で異なる DNA ポリメラーゼが関与する分子メカニズムの解明を目的とした。紫外線損傷はヌクレオチド除去修復の対象となるが、修復前に DNA 複製フォークが損傷箇所には到達すると、複製フォークの進行阻害が起こる。このような DNA 複製異常は、突然変異等のゲノム不安定性や細胞死を引き起こすことから、ヒトにおいては発がんや老化促進の原因となっている。生物は、DNA 損傷による複製フォークの進行阻害を回避する機構として、損傷乗り越え合成経路を獲得した。ヒトでは、色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物である DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) が、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る。一方、哺乳類には Pol η の構造的パラログである Pol ι が同定されているものの、その紫外線損傷への防御的役割については不明な点が多い。

代表者は、遺伝子改変マウスを用いた紫外線誘発皮膚発がん実験により、ヒトと同様に Pol η が皮膚表皮における突然変異抑制と発がん抑制に重要であることを示すと同時に、皮膚真皮においては Pol ι が突然変異と皮膚腫瘍の発生を抑制することを見出した。このような損傷乗り越え合成酵素の機能分担は、体内環境の異なる組織・細胞で生じる DNA 損傷の多様化に応

じて、適切な損傷乗り越え合成酵素を選択し、突然変異や細胞老化、細胞死などを防ぐ機構として重要である可能性を含んでいる。

このように高度な使い分けを可能にしている仕組みの詳細は不明だが、ユビキチン-プロテアソーム系による損傷乗り越え合成酵素の安定性制御の関わりを示す結果を代表者は得ており、異なる皮膚組織での損傷乗り越え合成酵素の制御機構を解明する糸口を見出すため、新たに見出した Pol η と脱ユビキチン化酵素との相互作用の解析を目指した。

研究打ち合わせ等の概要として、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い、研究全体を俯瞰した議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

先行研究で Pol η の相互作用因子として同定した脱ユビキチン化酵素 USP11 は、相似のドメイン構造を持つ USP4、USP15 とサブファミリーを構成している (図 1a)。そこで、HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを出発材料としてそれぞれの cDNA をクローニングし、C 末端に His タグを付して昆虫細胞発現系を用いて組換えタンパク質を調製した (図 1b)。

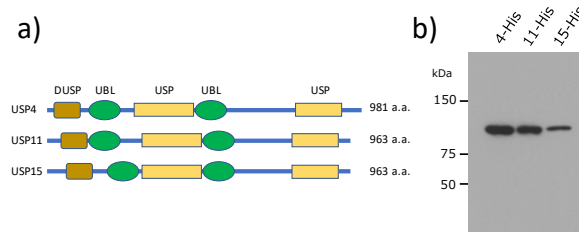


図 1 : a) USP 4、11、15 のドメイン構造
b) 抗 His タグ抗体による WB

一方、Pol η (1-713 a. a.) の構造的特徴として、N 末端側に活性触媒領域が、C 末側に他のタンパク質との相互作用領域が複数存在し (図 2)、C 末領域は全体的に安定した構造を取らない天然変性領域であると

推測される。脱ユビキチン化酵素との結合領域を調べる目的で、Pol η (1-713 a. a.) の酵素活性に必要なN末側領域 (1-511 a. a.)、他のタンパク質との相互作用領域を含むC末側領域 (431-713 a. a.)、さらに一部の相互作用領域を欠失したC末側領域 (512-713 a. a.) をGSTとの融合タンパク質として大腸菌発現系を用いて発現させ、GSHセファロースを用いて部分精製した。

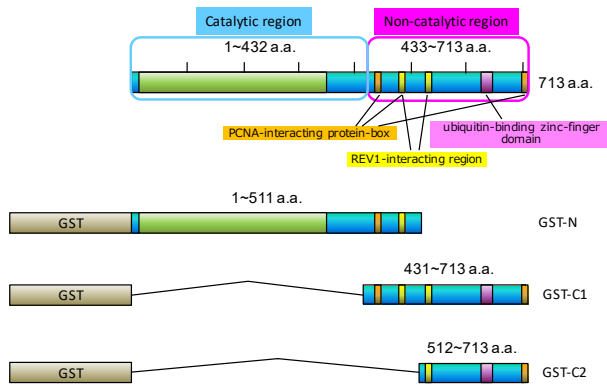


図2 : Pol η のアミノ酸配列上の特徴と各欠失変異体

これらの組換えタンパク質を用いてGSHセファロースによるプルダウン実験を行った結果、USP11-His と GST-Pol η (431-713 a. a.) の間で結合が検出された (図3)。

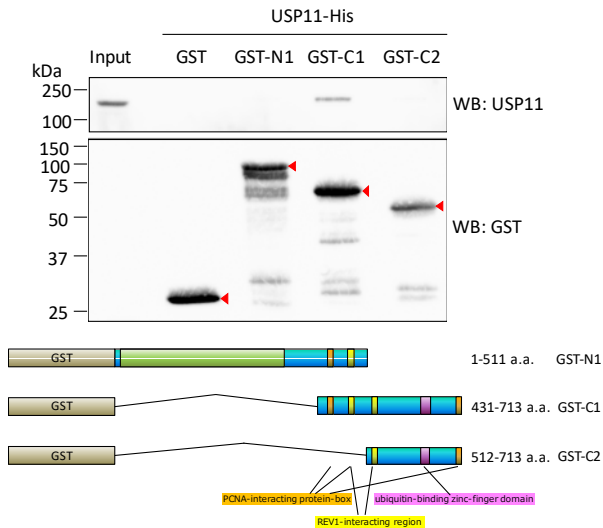


図3 : GST-Pol η と USP11-His のプルダウン実験

一方、USP4、USP15 と Pol η の間には明確な結合を検出できなかったことから、よく似たドメイン構造を持つ脱ユビキチン化酵素間でも、相互作用分子に対する特異性の高い結合を確認できた。Pol η には2箇所のREV1結合領域があり、REV1との安定した結合にはこの2箇所の領域が必要である。実験結果から、USP11とPol η の結合にも2箇所のREV1結合領域が必要である可能性が考えられた。

Pol η と REV1 との結合は、損傷乗り越え合成における異種ポリメラーゼの切り替え機構に重要であることから、USP11 と Pol η の結合は、損傷乗り越え合成関連因子のユビキチン化-脱ユビキチン化の役割を明らかにする上で重要なだけでなく、損傷乗り越え合成のポリメラーゼ切り替え機構への影響を考慮すると大変興味深い結果である。

現在、USP11 との結合がDNA損傷に応じたPol η の核内動態へ及ぼす影響を生細胞で調べるため、両者を蛍光タンパク質との融合タンパク質として安定発現する細胞を調製している。今後、局所DNA損傷の導入技術とライブセルイメージングを用いた解析手法を用い、詳細な解析を進める。同時に、マウス皮膚から調製した表皮ケラチノサイトと真皮線維芽細胞での紫外線照射後のPol η の安定性に、USP11 との結合がどのように関与するかを解析する予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

今回、Pol η との特異的な結合が検出された USP11 は、DNA二重鎖切断 (DSB) の修復機構である相同組換えにおいて、その脱ユビキチン化活性により制御的な役割を果たすことが報告されている。Pol η も相同組換えで起こる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との関係にも注目していきたい。

代謝活性や酸素飽和濃度、pHなど、組織・細胞を取り巻く環境はさまざま、それに応じて生じるDNA損傷の種類や量なども多様である。代表者が見出した、発生学的に異なる皮膚組織で異なる損傷乗り越え合成が突然変異や皮膚腫瘍の抑制に重要であるという知見は、哺乳類細胞に損傷乗り越え合成活性を示す酵素が複数種類備わっている意義を明らかにする上で重要な手掛かりになると考える。このような研究が発展すれば、DNA損傷に起因する突然変異の発症メカニズムを組織レベルで統括・制御する機構の解明へとつながると期待される。

[4] 成果資料

現時点で、研究成果は未発表である。