

DNA 損傷乗り越え複製ポリメラーゼ Polη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 30 万円

[2] 研究経過

損傷乗り越え複製 (translesion synthesis; TLS) は誤りがち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超突然変異を導入する機構に働いていると考えられるが複製型 DNA polymerase から損傷乗り越え型 DNA polymerase へのチェンジ機構制御やどのように抗体可変領域にリクルートされてくるかはよくわかっていない。そこで我々は Polη の 2 つの ubiquitin 結合モチーフに注目し、レーザー照射で DNA 損傷部位に集まる ubiquitin 前駆体 UBA80 (RPS27a) との関連に注目し解析を行った。

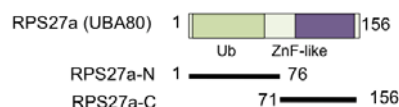
[3] 成果

(3-1) 研究成果

TLS は通常の複製過程が DNA 損傷部位でブロックされ、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 polymerase の交換が行われ進行する。Polη は原核生物からヒトまで保存されているが、各生物種の Polη 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 末側に 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る。一方、レーザー照射で DNA 損傷部位に集まる ubiquitin 前駆体 UBA80 (RPS27a) は真核生物に高度に保存されており N 末

側に ubiquitin があり C 末側によく保存された Zn フィンガー様のドメインを持っている (Fig1)。前年度は GST-RPS27a を使った GST プルダウンにより 50 種以上の相互作用タンパク質を同定した。

Fig.1



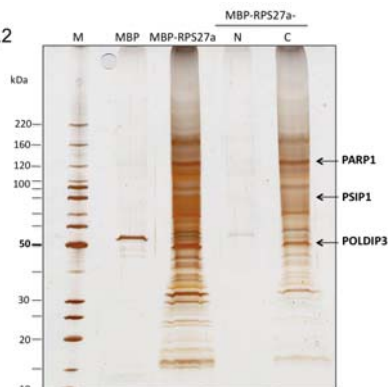
ZnF-like domain

<i>Human</i>	119	RECPSDECGAGVFMASHFDRHYCGKCCLTYCFNK	152
<i>Apis cerana</i>	127	RECPMEQCGAGVFMAAMEDRHYCGKCGYTLVFNK	160
<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	KECPNATCGAGTFMASHFDRHYCGKCGCLTYVYQK	152

x~~E~~C~~P~~x~~x~~C~~G~~A~~G~~x~~x~~x~~x~~x~~x~~D~~R~~H~~Y~~C~~G~~K~~C~~x~~x~~T~~x~~x~~x~~x~~K~~

今回、ubiquitin 部分と ZnF-like なドメインの deletion mutant を作り、GST プルダウンによりそれぞれのドメインに結合するタンパク質を新たに同定した。その結果 ubiquitin 部分は GST 結合による立体障害で結合タンパク質がほとんど得られなかったが、ZnF-like ドメインの結果から RPS27a に結合する多くのタンパク質がこのドメインを介して結合していることが分かった (Fig2)。

Fig.2



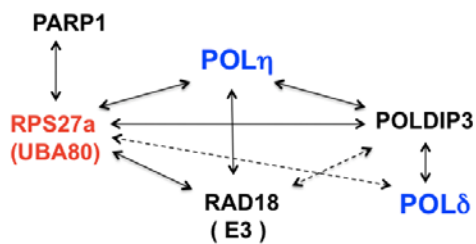
前回、RPS27a の相互作用タンパク質として SWI/SNF, B-WICH などのクロマチンリモデリングファクター、ヘテロクロマチン関連タンパク質、DNA トポイソメラーゼや DNA リガーゼなど DNA

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が、これらの多くが ZnF-like ドメインで結合していることが示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

RPS27a が DNA 複製・修復に関わっていることが、GST プルダウンを用いたプロテオーム解析及び GFP-RPS27 が細胞で DNA 損傷部位に集積することなどによって明らかになった。また、RPS27a と Pol η が相互作用することをウエスタンで確認しているが、今回のドメインを使った GST プルダウンの nanoLC/MS/MS 解析により新たに POLDIP3 が検出された。POLDIP3 は複製 DNA polymerase である POLD (DNA polymerase delta) の結合タンパク質として発見されたが、我々の解析で TLS DNA polymerase とも結合できることが示されている。損傷乗り越え複製が免疫系細胞の抗体可変領域で超突然変異を導入する機構に働いている場合、RPS27a と polymerase exchanger 因子と予想される POLDIP3 がこの変異導入機構に関わっていることが十分予想される (Fig. 3)。

Fig.3



[4] 成果資料

論文は準備中です。