

課題番号 55

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 20 万円

[2] 研究経過

複製の鋳型鎖に生じた DNA 損傷は、複製フォークの進行を阻害することでゲノム情報を不安定化する。これに対抗する機構の一つに、損傷 DNA を含む鋳型鎖を利用して直接複製反応を行える特殊な DNA ポリメラーゼの働く損傷乗り越え合成 (translesion synthesis: TLS) がある。生化学的な解析から、何らかの損傷に対して TLS 活性を示す哺乳類の DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) は 10 種類にのぼる。その中で、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) は、紫外線で生じる主要な損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジン二量体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。特に、紫外線などの環境由来因子による DNA 損傷を最も受けやすい組織の一つである皮膚での Pol η の欠損は、正常と比較して紫外線誘発上皮系皮膚がんの発症頻度を数千倍に上昇させる。一方、Pol η 欠損マウスを用いた解析で、皮膚真皮における紫外線誘発がんの頻度は Pol η の遺伝子型とは関係ないことがわかった。一方、表皮と真皮に由来する皮膚腫瘍から調製した *Trp53* 遺伝子の配列解析から、紫外線で生じる主要な C to T トランジション変異は、正常な場合に比べて Pol η を欠損した真皮において低くなることが判明した。さらに、マウス皮膚の表皮および真皮由来の培養細胞に紫外線を照射した結果、表皮に比べて真皮の Pol η はユビキチン-プロテアソーム系依存的な分解を受けやすいことを明らかにした。代表者は、マウス皮膚真皮の紫外線誘発皮膚腫瘍の抑制において Pol η の構造的パラログである Pol θ の役割が重要であることを報告しており (Ohkuma, Yokoi, et al M.C.B., 2006)、

本研究課題で見出した Pol η と脱ユビキチン化酵素 USP11 との相互作用の解析が、真皮における Pol η と Pol θ の機能制御解明の糸口になると考えている。

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加齢研フェローおよび同研究所の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

これまでに、USP11 との結合に関わる領域として Pol η の C 末側 431-713 アミノ酸 (C1) に含まれる天然変性領域を同定した。この領域内には TLS ポリメラーゼの一つである REV1 や複製のアクセサリ因子である PCNA と相互作用するモチーフ配列およびユビキチン分子と結合する UBZ ドメインが含まれる。そこで、さらに結合部位を絞り込む目的で、欠失変異体を用いた解析を行った (図 1)。

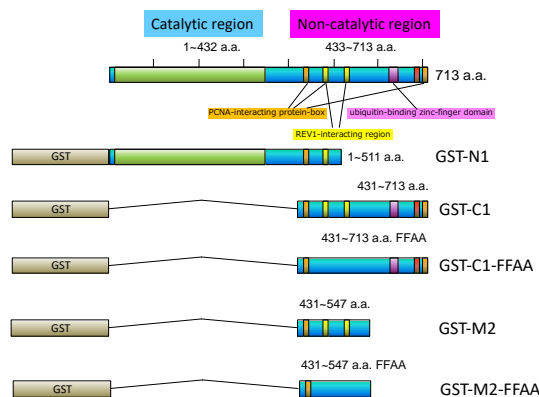


図 1 : Pol η の欠失変異体

欠失変異体は、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させて GSH セファロースで精製した。USP11 は昆虫細胞発現系で発現させ、TALON レジンとイオン交換カラムで精製して実験に用いた。GSH セファロースによるブルダウン実験の結果、Pol η の 431-547 アミノ酸が USP11 の結合には十分であり、REV1 との結合モチーフはわずかに結合に影響している可能性が示唆された。一方、548-713 アミノ酸にも結合を強める役割のあることが示された (図 2)。

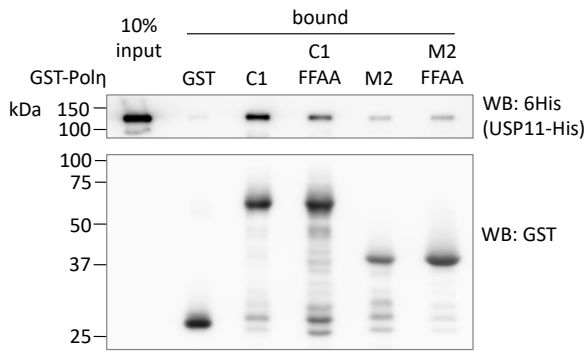


図2：プルダウン実験の結果

次に、USP11がPolηの安定性への関与を調べるため、ヒト正常線維芽細胞WI38 VA13細胞を用いて新規タンパク質合成とユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解を阻害してPolηタンパク質のターンオーバーを調べた(図3)。

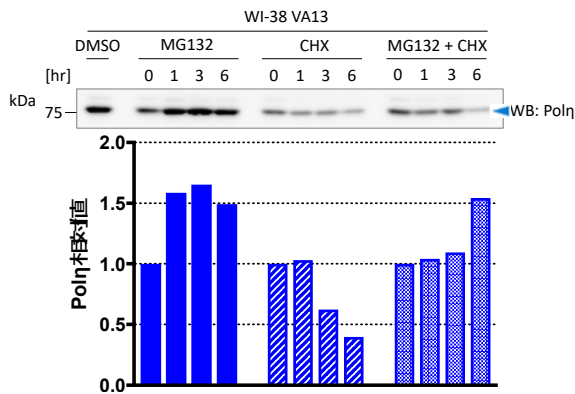


図3：Polηタンパク質のターンオーバー

α-チューブリンで補正したPolηの量は、新規タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド(CHX)存在下で3~6時間で50%まで低下し、同時にユビキチン-プロテアソーム系タンパク質分解を阻害(MG132)すると安定したことから、Polηは主にユビキチン-プロテアソーム系で分解されることがわかった。そこで、USP11のPolηの安定性への影響を調べるため、CHX存在下でノックダウン実験を行った(図4)。

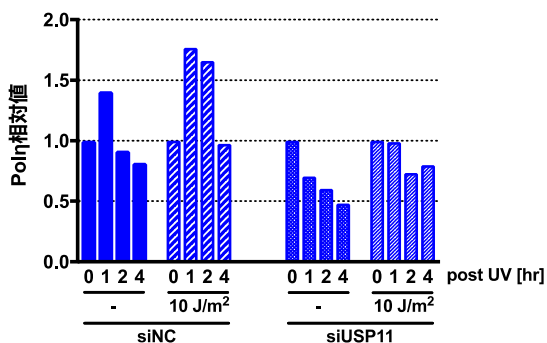


図4：USP11のPolηタンパク質安定性への寄与
その結果、コントロールに比べて、USP11のノック

ダウンによりPolηタンパク質のレベルが明らかに低下した。また、紫外線照射で見られたPolηタンパク質の一過的な増加も観察できなかった。これらの結果から、USP11はPolηタンパク質の安定化に寄与することが示された。一方、USP11をノックダウンした細胞の紫外線感受性をコロニー形成を指標にして調べたが、影響は見られなかった(図5)。

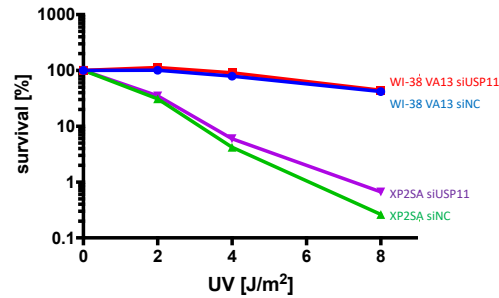


図5：紫外線感受性へのUSP11ノックダウンの影響

以上から、本研究課題では、ユビキチン-プロテアソーム系に拮抗する様式でPolηの安定性に寄与するPolηの結合因子として脱ユビキチン化酵素USP11を新たに同定した。

(3-2) 波及効果と発展性など

TLSポリメラーゼの機能分担は、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TLSポリメラーゼを選択し、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。本研究の成果として、TLSポリメラーゼの調節制御機構としてユビキチン-プロテアソーム系が重要であり、機構の解明には脱ユビキチン化酵素の役割を明らかにすることが必要であることを示すことができた。この成果は、発がん・老化・免疫機能でのTLSポリメラーゼの役割の解明に貢献すると期待される。このような研究を足掛かりとして関連分野の研究者との交流も生まれ、今後の新たな共同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

案濟萌、西村潤、菅野新一郎、安井明、菅澤薫、花岡文雄、横井雅幸

DNAポリメラーゼ・イータと脱ユビキチン化酵素の相互作用の解析

第42回日本分子生物学会年会(2019)