

課題番号 1

TLS ポリメラーゼの安定性調節機構と 紫外線誘発皮膚発がんに関する研究

[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 15 万円

[2] 研究経過

DNA 損傷部位で停止した複製反応の速やかな再開は、複製フォークの崩壊や染色体の不安定化を防ぐために極めて重要である。DNA 損傷トレランスは、DNA 損傷があっても DNA 合成を止めずに複製を完了させる機構である。哺乳類細胞における主要な DNA 損傷トレランスの経路は、損傷を含む鋳型鎖に対して DNA 合成を行える特殊な DNA ポリメラーゼが複製の停止を回避する損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) 経路である。色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物 DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) は、紫外線で生じる主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 DNA ポリメラーゼである。特に、紫外線をはじめとする環境由来因子により最も DNA 損傷を受けやすい組織の一つである皮膚において、Pol η の欠損は、正常な皮膚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。その一方で、損傷のない鋳型に対する忠実度は極めて低いいため、Pol η の働きは損傷部位に限定させる必要がある。そのような機構の一つが、複製アクセサリ因子 PCNA のモノユビキチン化と脱ユビキチン化による制御である。また、Pol η 自身もユビキチン化されることが報告されている。Pol η の C 末端付近でのモノユビキチン化は、PCNA との結合を負に制御する。さらに、ポリユビキチン化は分解を促進すると考えられているが、これら Pol η のユビキチン化を介した TLS の制御には、不明な点も多く残されている。

代表者は、マウス皮膚表皮の紫外線誘発皮膚がんの

抑制において、Pol η が重要であることを報告している (Ohkuma, Yokoi, et al M.C.B., 2006)。これに関連して、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-プロテアソーム依存的に分解しやすいことを明らかにした。一方で、これまでの共同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から、USP11 は Pol η タンパク質の安定化に寄与することを示した。これらを踏まえて、本共同研究では、皮膚での紫外線誘発がんの抑制における Pol η のユビキチン化と脱ユビキチン化による安定性調節の理解を深めることを目的としている。そこで、Pol η のユビキチン化を担うユビキチン E3 リガーゼの同定と脱ユビキチン化関連タンパク質の探索およびそれらの解析を試みた。

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加齢研フェローおよび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

第 1 に、Pol η のモノユビキチン化とポリユビキチン化を担う E3 リガーゼを同定する目的で、Split-GFP システムを利用したスクリーニング系の確立を検討した。Split-GFP システムでは、GFP を二分割し、相互作用を調べたい二つの分子との融合タンパク質として発現させる。二つの分子が相互作用すると、二分割した GFP が結合して機能的な GFP を再構成することができる。この蛍光を指標に、タンパク質間相互作用を検出することができる。本研究では、GFP の N 末端断片を Pol η の C 末端に融合させる発現コンストラクト、もう一方の C 末端断片をユビキチンの N 末端に融合させる発現コンストラクトをそれぞれ作成し、ヒト骨肉腫由来細胞 U2OS で同時に発現させた。この細胞を過剰チミジン処理で S 期同調したのちに紫外線を照射し、6 時間後に蛍光強度を測定した。その結果、核内の蛍光強度が上昇する傾向が見られた (図 1)。ただし、スクリーニングを実施するには相対

蛍光強度を高める必要があると判断し、特に C 末端断片を融合させたユビキチンの発現レベルの強化を検討中である。なお、スクリーニングは、Cullin 型、F-box 型、SOCS 型、RING フィンガー型の各ユビキチン E3 リガーゼに対する siRNA ライブラリー (標的遺伝子 500 以上) を用い、紫外線依存的な GFP 再構成による蛍光の消失を指標に実施する予定である。

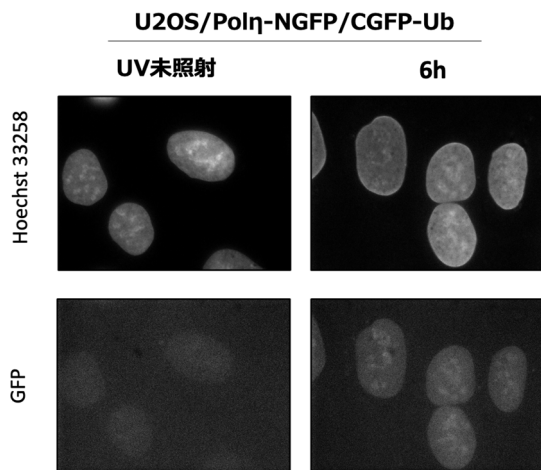


図 1 A Split-GFP システムによるユビキチン化 Polη の検出系

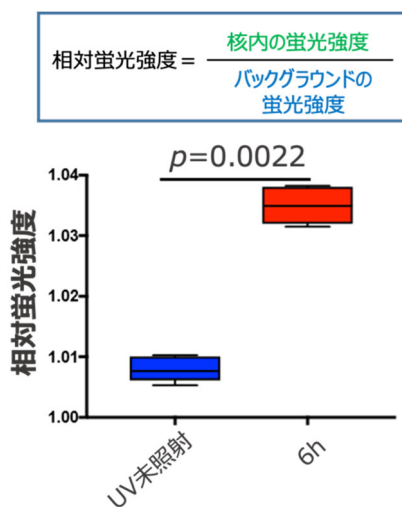


図 1 B 紫外線依存的な GFP の再構成

第 2 に、USP11 以外に、Polη と相互作用する脱ユビキチン化酵素の解析を行った。具体的には、HA-FLAG タグ付き Polη を発現させた HeLa 細胞の核抽出液を材料に、Polη をタンデムアフィニティ精製した過程で Polη とともに得られたタンパク質を質量分析により解析した。その結果、USP11 に加えて、脱ユビキチン化酵素 USP34 が検出された。そこで、siRNA による USP34 のノックダウンを行い、Polη と PCNA の紫外線応答における変化を調べた。S 期の細胞に紫外線で DNA 損傷を誘発させると、クロマチン上で

PCNA がモノユビキチン化され、Polη がクロマチンへ集積する。そこで、siRNA 処理した U2OS 細胞から CSK バッファーの可溶性画分とクロマチンを含む不溶性画分を調製し、PCNA と Polη、USP34 を検出した (図 2)。

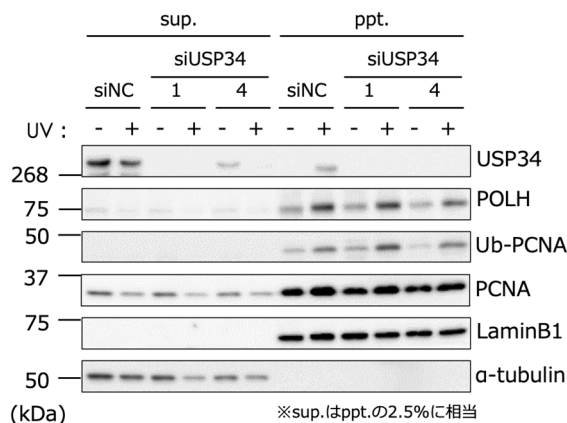


図 2 USP34 ノックダウンによる PCNA と Polη の紫外線応答への影響

その結果、USP34 のノックダウンにより、紫外線依存的な PCNA のモノユビキチン化が促進する傾向が見られる一方で、不溶性画分への Polη の集積が減弱する傾向が見られた。また、USP34 は紫外線依存的に不溶性画分で検出されたことから、細胞の紫外線応答への関与が示唆された。これらの結果は、USP34 が PCNA と Polη に働きかけて TLS に関わる可能性を示唆している。以上を踏まえて、今後、USP34 が Polη を安定化している可能性や Polη を効率よく損傷部位にリクルートする可能性を中心に、USP34 の TLS への関与について解析を進める。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究の成果として、Polη の安定性調節における理解を深めることや新たに脱ユビキチン化による Polη のリサイクルシステムの存在を提示できる可能性を含んでいる。このような研究を足掛かりとして、今後、関連分野の研究者との交流も生まれ、新たな共同研究の発展に寄与すると期待している。特に、クロマチン上での反応を理解する上で、ヒストン修飾因子やクロマチン構造変換因子の関与を検討する必要がある。そのような分野の研究者との交流を生む契機となる成果も求めていきたい。

[4] 成果資料

現時点で、研究成果は未発表である。