

課題番号 2

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

損傷を含む DNA を鋳型にして DNA 合成を行える、特殊な TLS ポリメラーゼが働く損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) は、損傷部位における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り、損傷部位で DNA 合成を止めずに複製を完了させる DNA 損傷トレランス機構の主要な経路である。TLS ポリメラーゼの一つである DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) 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り、紫外線で生じる主要な損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体を唯一単独で効率よく正確に乗り越えて DNA 合成を行える。したがって、Pol η の皮膚における機能欠損は、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。一方で、損傷のない鋳型に対する忠実度は極めて低いため、Pol η の働きを損傷部位に限定させる機構が遺伝情報の安定性の維持に重要である。そのような機構の一つが、複製アクセサリ因子 PCNA をはじめとした、TLS 関連因子のユビキチン化と脱ユビキチン化である。例えば、PCNA のモノユビキチン化と脱ユビキチン化は損傷部位への Pol η のリクルートを調節し、ポリユビキチン化を介した TLS 因子の分解によるタンパク質量の調節もまた、TLS 経路の制御には重要であると考えられる。Pol η においては、C 末端付近でのモノユビキチン化が PCNA との結合を負に制御し、ポリユビキチン化は分解を促進するという報告がある。しかしながら、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。

これまでに代表者は、Pol η の相互作用分子として脱ユビキチン化酵素 USP11 を同定し、USP11 の発現抑制が Pol η の安定性を低下させることと Pol η の C 末領域が USP11 と直接相互作用することを見出し、昨年度の本申請課題の成果として、Pol η と相互作用する新たな脱ユビキチン化酵素として同定した USP34 の TLS への関与を示唆する結果を得た。これに加えて、Pol η のユビキチン化に関わる E3 ユビキチンリガーゼのスクリーニング系として Split-GFP システムの導入を検討した。

今年度は、紫外線誘発皮膚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、Split-GFP システムの条件検討を進めつつ、Pol η の分解に関わると期待される RING 型ユビキチン E3 リガーゼの候補を新たに複数見出した。さらに、Pol η 結合因子として同定した脱ユビキチン化関連タンパク質が Pol η の安定性に関わる可能性を検討した。

本研究の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、二つの実験に取り組んだ。まず、昨年度に引き続き Split-GFP システムを利用したスクリーニング系の確立を目指して、懸案であった GFP の C 末端断片を融合させたユビキチンの発現レベルの引き上げを試みた。複数の高発現プロモーターを用いても期待される発現量は得られず、スクリーニングに十分な再構成 GFP の輝度値に達していないと判断した。今後は、内在性ユビキチンをノックダウンするなど、引き続き Split-GFP システムのスクリーニングへの応用を検討する。二つ目として、コムギ無細胞発現

系により調製した 288 種類の RING 型 E3 ユビキチンリガーゼと Polη の結合実験を行い、これまでに Polη のユビキチン化もしくは Polη との相互作用について報告のない分子を複数見出した。発光強度に基づく相互作用強度の上位 10 位までについて、ヒト骨肉腫由来細胞 U2OS で発現抑制して S 期同調し、紫外線照射の有無で Polη の発現レベルを調べた (図 1)。その結果、Polη のポリユビキチン化について既に報告のある Pirh2 発現抑制との比較で同等もしくはそれ以上に Polη の発現レベルが上昇した候補分子を複数見出した。今後、これらの E3 リガーゼが Polη のポリユビキチン化から分解の過程に関わる可能性について、*in vitro* のユビキチン化アッセイなども含めて調べていく。

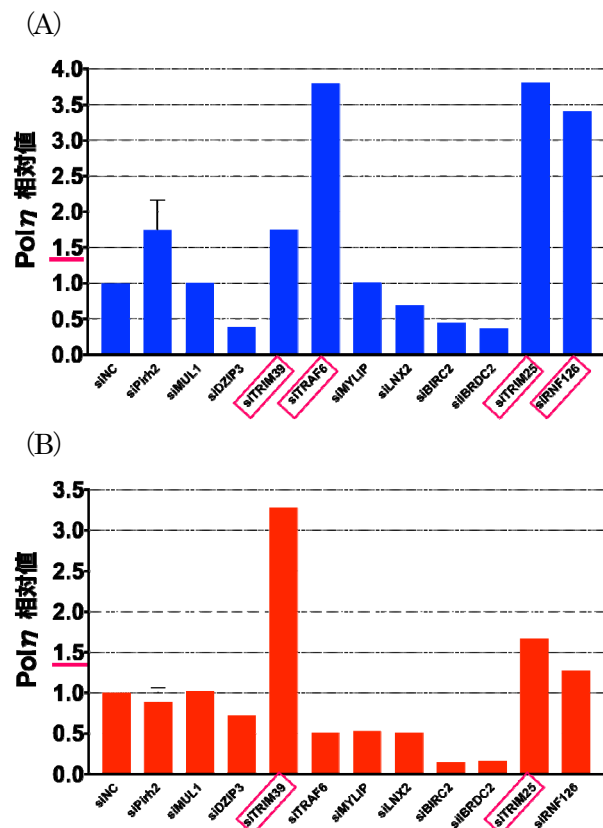


図 1 RING 型 E3 ユビキチンリガーゼの発現抑制で変動する細胞内 Polη の総タンパク質量
(A) 紫外線未照射時の Polη のレベル
(B) 紫外線照射後の Polη のレベル

第 2 に、Polη との相互作用を見出した脱ユビキチン化酵素 USP11 と USP34 の発現抑制が Polη の安定性に及ぼす影響をヒト WI38VA13 細胞を用いて調べた。その結果、新規タンパク質合成を阻害することで、USP11 発現抑制に伴う Polη タンパク質量の減弱が見られた。一方で、同様の実験を USP34 について行ったものの、Polη の安定性に影響は認め

られなかった (図 2)。

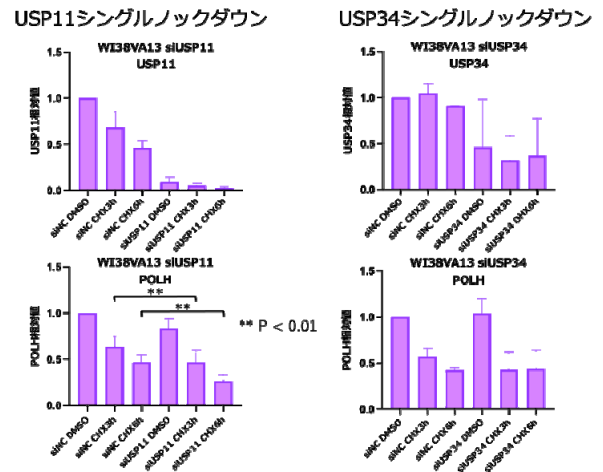


図 2 Polη の安定性における USP11 および USP34 の発現抑制と新規タンパク質合成阻害の影響
上段：USP11 および USP34 の発現量
下段：Polη の発現量

しかしながら、USP11 に比較して USP34 は安定であり、発現抑制効果も限定的であったことから、Polη の安定性における USP34 の役割を明確にするために、現在、ゲノム編集による USP34 ノックアウト細胞の作成を準備中である。

(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がある。また、今年度の成果である Polη の安定性への関与が示唆された E3 ユビキチンリガーゼには、DNA 損傷応答や細胞周期制御に重要ながん抑制遺伝子産物 p53 と関係する分子が含まれることから、紫外線誘発皮膚発がんや TLS ポリメラーゼの安定性調節機構における p53 の関与について新たな展開が期待される。

[4] 成果資料

(1)

脱ユビキチン化酵素による損傷乗り越え合成の制御機構の解析

仲野由佳梨、案濟萌、菅野新一郎、安井明、酒井恒、菅澤薫、花岡文雄、横井雅幸

第 44 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表)

2021 年 12 月 1-3 日、横浜