

課題番号 87

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20万

[2] 研究経過

損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) は、DNA 損傷を回避して DNA 複製を継続させる DNA 損傷トレランスの主要経路である。TLS では、損傷による複製の停止に伴いモノユビキチン化された複製因子 PCNA を足場に、損傷した DNA を鋳型として利用できる TLS ポリメラーゼが損傷部位に限定した複製を行う。

DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) は、紫外線などで生じる損傷に対応する重要な TLS ポリメラーゼである。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。

Pol η は、ポリユビキチン化によりプロテアソーム依存的に分解されるほか、その C 末端領域でのモノユビキチン化はモノユビキチン化 PCNA との結合を抑制することが報告されている。このように、Pol η と PCNA のユビキチン化状態の調節は、Pol η の関わる TLS の制御に重要である (図 1)。

本研究では、Pol η の相互作用因子として同定された脱ユビキチン化酵素 USP11 と USP34 に着目し、Pol η や PCNA のユビキチン化に関連した TLS 制御機構における役割について理解を深めることを目的とした。

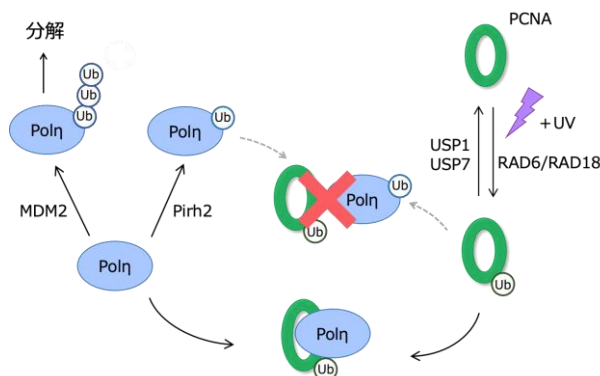


図1 Pol η の関わる TLS におけるユビキチン化修飾

なお、本研究の打ち合わせ等の概要として、新型コロナウイルス感染症対策として主にメールにより、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研究全体を俯瞰した議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

当研究室のこれまでの研究から、USP11 は Pol η と直接結合し、非同調細胞において Pol η の安定性に関わる可能性が示唆されていた。一方で、TLS は主に S 期で起こるため、過剰チミジン処理で G1/S 期に同調したヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞を用いて、USP11 と USP34 の発現抑制の影響を調べた。その結果、Pol η は G1/S 期で増加し、それが USP11 の発現抑制に伴い減弱したことから、S 期に先立って Pol η を増加させる過程に USP11 が関わることを示された。(図 2)

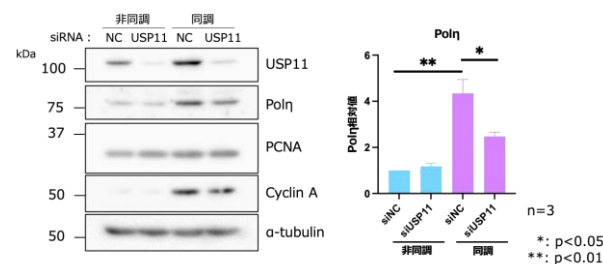


図2 USP11 は G1/S 期での Pol η の増加に関わる

また、USP11 と USP34 も G1/S 期で増加したが、USP34 を発現抑制しても Polη の発現量に影響は認められなかった。これに対して、S 期の開始に重要な CDC7 キナーゼを阻害して細胞を主に G1 期に同調すると、Polη は検出限界レベルまで低下した。Polη の複製の正確性は損傷部位以外で極めて低いことから、DNA 修復に伴う DNA 合成などに Polη が関わらないよう、積極的に分解されている可能性が示された (図 3)。また、CDK2 キナーゼ阻害作用のある lovastatin による G1 期同調あるいは血清飢餓による G0 期同調でも、Polη の発現量の低下が認められた。

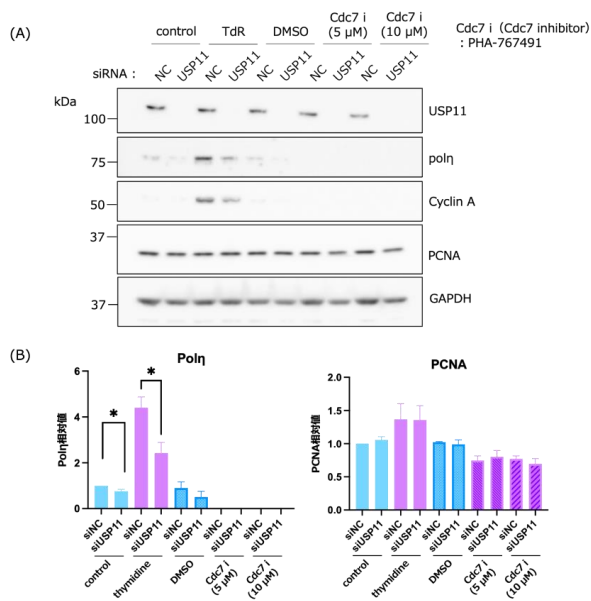


図 3 Polη は G1 期で積極的に分解される

次に、損傷依存的なクロマチンでの Polη の増加と PCNA のモノユビキチン化への USP11 と USP34 の関与を調べるため、それらを発現抑制した S 期の細胞を 0.1 M NaCl, 0.1% Triton X-100 を含む緩衝液で処理し、クロマチンを含む不溶性画分を調製して実験に用いた。その結果、USP11 の発現抑制により、紫外線照射に伴い不溶性画分で検出されるモノユビキチン化 PCNA と Polη が有意に減弱した。一方で、USP34 の単独抑制および USP11 と USP34 を同時に発現抑制しても、USP34 の関与は認められなかった。これにより、USP11 が PCNA のモノユビキチン化を介して Polη の損傷部位への導入に関わる可能性が示された (図 4)。

以上のように、本研究は、細胞周期特異的な Polη の増加と損傷に応答した PCNA のモノユビキチン化における脱ユビキチン化酵素 USP11 の関与を示唆するものである。USP11 の脱ユビキチン化活性がどのように関わるかという本質的な問いに対しては、さらに

解析が必要であるものの、Polη による TLS の制御機構の理解に向けて一定の意義のある成果が得られた。

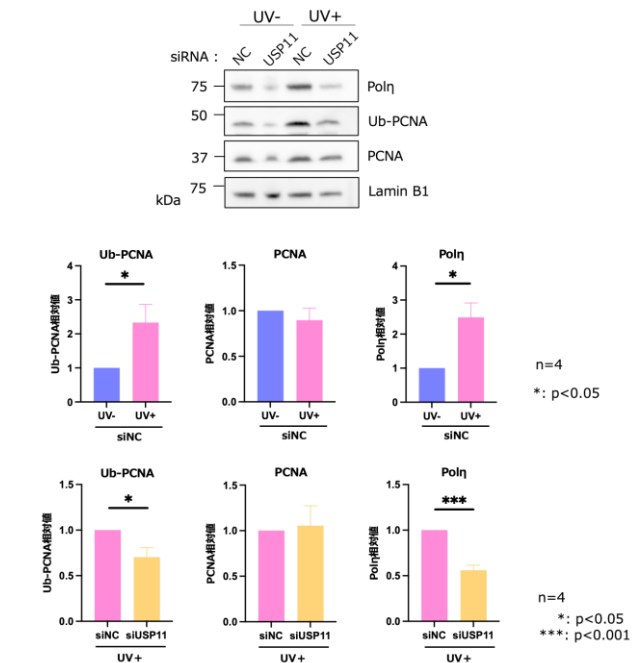


図 4 USP11 は PCNA のモノユビキチン化を介して損傷部位への Polη の導入に関与する

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、TLS ポリメラーゼである Polη の安定性が細胞周期を通して調節されている可能性を示唆する結果と PCNA のモノユビキチン化に寄与する脱ユビキチン化酵素に関する新たな可能性を示した。以上の結果は、DNA 損傷トレランスに関与するタンパク質の脱ユビキチン化を介した制御機構をより深く理解する上で重要な成果であり、今後の発展性が期待される。

[4] 成果資料
特になし