

## TLSポリメラーゼの安定性を介した脱ユビキチン化酵素の ゲノム安定性への寄与

[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13万円

[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。DNA ポリメラーゼ・イータ (Polη) は、損傷 DNA を鋳型に直接 DNA 合成を行える代表的 TLS ポリメラーゼで、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に対して単独で効率よく正確性の高い TLS を行う。Polη の機能欠損は、紫外線誘発皮膚がんの発症頻度を数千倍に上昇させることから、その役割は重要である。一方で、Polη は損傷のない鋳型に対する忠実度が極めて低いため、遺伝情報の安定性の維持には、その働きを損傷部位に限定させる機構が不可欠である。その機構として、Polη と複製因子 PCNA のユビキチン化・脱ユビキチン化が報告されている (図1)。PCNA のモノユビキチン化と脱ユビキチン化は Polη との相互作用を正および負に調節し、Polη のユビキチン化は

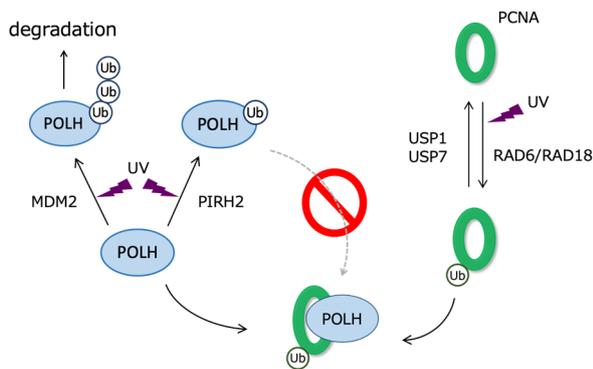


図1 Polη の関わる TLS におけるユビキチン化修飾

プロテアソーム依存的な分解や PCNA との結合に阻害的に作用することが報告されている。

これまでに、加齢医学研究所の安井明フェローならびに菅野新一郎講師との共同研究により、Polη の相互作用因子として同定した脱ユビキチン化酵素 USP11 と USP34 について、Polη や PCNA のユビキチン化・脱ユビキチン化に関連した TLS 制御機構での役割を解析してきた。その結果、USP11 について、クロマチンにおける PCNA のモノユビキチン化維持に関わる可能性を示した。また、USP11 が G1/S 期での Polη の安定性に寄与する可能性を示した。さらに、細胞周期を通した Polη の発現量の変動解析から、Polη の発現は G2/M 期に高く、M/G1 期にかけてプロテアソーム依存的に分解されることを示した。

安井 明フェローと菅野新一郎講師との本研究課題に関する議論・打ち合わせ等は、必要に応じてメールを中心に行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Polη が M/G1 期にかけてプロテアソーム依存的に低下することを示した先の研究結果を踏まえ、Polη のアミノ酸配列にユビキチンリガー APC/C の認識配列があるか、デグロン予測サイト (Degronopedia) により解析した。その結果、D-BOX (xxRxxLxx) が Polη の 232-239 アミノ酸に見出された。また、aurora A kinase 認識配列 (R/K/N-R-x-S/T-B) が D-BOX と重なるように 233-237 アミノ酸に存在した。複製ライセンス化阻害タンパク質である geminin は、G1 期に自身の D-BOX を介して APC/C の基質認識サブユニットである FZR1 に認識されてユビキチン化されるが、この認識は D-BOX と重複している aurora A kinase 標的部位のリン酸化により阻害されることが知られている。そこで、Polη の発現量の変動に APC/C が関わるか検証するため、APC/C の基質認識サブユニットである FZR1 と CDC20 に着目した。まず、FZR1 を特異的 siRNA で発現抑制したところ、予想外の結果として、血清飢餓解除後の Polη の発現上昇が認められず、M/G1 期における Polη の発現低下に FZR1

が関与するかを検証することはできなかった (図2)。

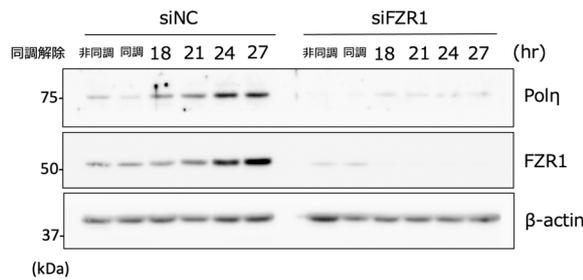


図2 CDC20 阻害剤処理と Polη の発現レベル

次に、もう一つの基質認識サブユニットである CDC20 に対する阻害剤 (Apcin) の効果を調べた。その結果、わずかではあるが、Apcin の濃度依存的に Polη の安定性の向上が認められた (図3)。

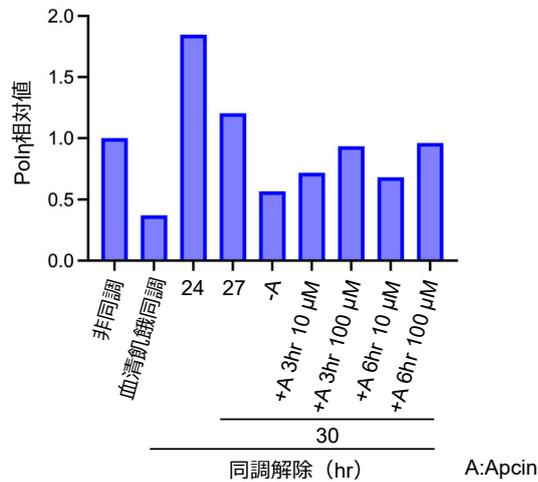


図3 CDC20 阻害剤処理と Polη の発現レベル

そこで、D-BOX および aurora A kinase のリン酸化部位にアラニン置換変異を導入した変異体 Polη (R234A/L237A : RA/LA および T236A : TA) を安定発現する U2OS 細胞を作成し、ノコダゾールによる M 期同調と同調解除後の Polη の発現レベルを調べた。その結果、D-BOX 変異体において、同調解除直後に発現量が增大する傾向が認められた (図4)。

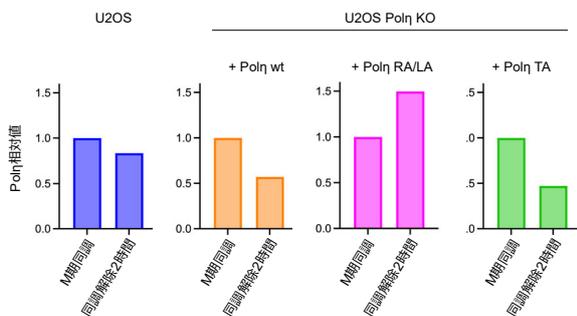


図4 M 期進行に伴う変異型 Polη の発現量の変動

そこで、D-BOX 変異体が G1 期に安定に存在することが、遺伝情報の不安定化を引き起こすかを調べるため、Na/K ATPase の阻害剤であるウアバイン耐性を指標に、紫外線照射後の突然変異頻度を調べた。その結果、コントロールである Polη 欠損 U2OS で突然変異頻度が上昇したのに対し、変異体発現細胞ではいずれも突然変異の上昇は認められなかった (図5)。

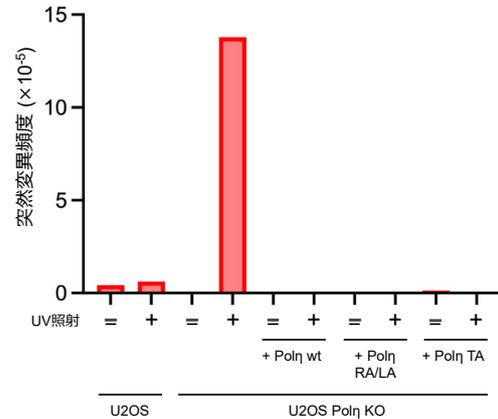


図5 変異型 Polη 発現細胞の突然変異頻度

この理由として、導入した変異が Polη の TLS 活性に影響している可能性を排除できないこと、また変異の固定に必要な日数が十分でない可能性がある。また、FZR1 と CDC20 を任意のタイミングで短時間のうちに機能を抑制する方法として、オーキシンドグロン系の導入を検討している。

### (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の M 期から G1 期にかけてユビキチン依存的なタンパク質分解を受けている可能性が示唆された。さらに、APC/C の関与を示唆する結果が得られたことから、時期特異的な Polη の分解に関わる E3 リガーゼの有力な候補となりうる。今後は、細胞周期依存的な Polη の発現制御における APC/C と脱ユビキチン化酵素 USP11 の役割を解析することで、G1 期で Polη のタンパク質量を制限し、S 期に発現量をあげる機構とその生理的意義を明らかにしたい。これにより、ユビキチン化と脱ユビキチン化を介した TLS の制御とゲノム安定性の関係についてさらに理解を深めることができると期待される。

### [4] 成果資料

現時点で、研究成果は未発表である。