

## 課題番号 34

# 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)

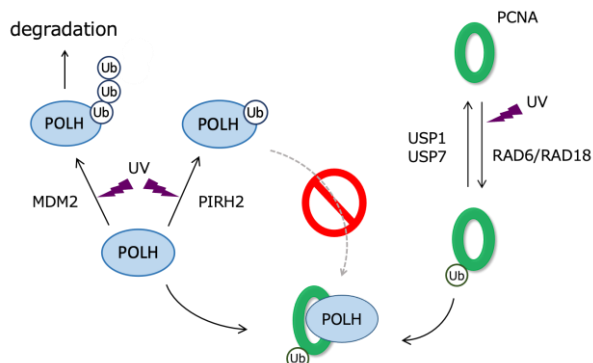
対応者：安井 明

(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 損傷の修復は伴わずに 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 (Pol $\eta$ ) は、紫外線で生じ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と正確性の高い TLS を行う。一方で、非損傷 DNA の複製では忠実度が極めて低いため、Pol $\eta$  の働きを損傷部位に限定させる機構が重要である。その一つとして、Pol $\eta$  と複製因子 PCNA のユビキチン化・脱ユビキチン化が知られ、PCNA のモノユビキチン化と脱ユビキチン化は Pol $\eta$  との相互作用を正および負に調節し、Pol $\eta$  のユビキチン化はプロテアソーム依存的な分解や PCNA との結合を阻害することが報告されている (図 1)。

図1 Pol $\eta$  の TLS でのユビキチン修飾と機能制御

これまでに、加齢医学研究所の安井明フェローとの共同研究により、Pol $\eta$  の相互作用因子として同定した脱ユビキチン化酵素 USP11 が、クロマチンにおける PCNA のモノユビキチン化維持と、G1/S 期での Pol $\eta$  の安定性に寄与する可能性を示した。また、細胞周期を通じた Pol $\eta$  の発現量の変動解析から、Pol $\eta$  の発現

は G2/M 期で高く、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。さらに、昨年度の研究成果として、M/G1 期で働くユビキチンリガーゼ APC/C に着目し、触媒サブユニット CDC20 を含む APC/C<sup>CDC20</sup> の阻害剤や Pol $\eta$  に見出された APC/C 標的配列の変異体を用いた解析を通して、APC/C<sup>CDC20</sup> が M/G1 期での Pol $\eta$  の分解に関わる可能性を示した。

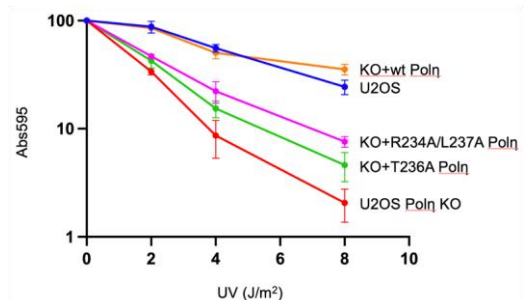
本研究では、Pol $\eta$  の APC/C 標的配列の変異が細胞の紫外線感受性に与える影響を調べるとともに、FZR1 を触媒サブユニットとする APC/C<sup>FZR1</sup> が TLS ポリメラーゼの M/G1 期での発現レベルの調節に関与するかを調べた。

なお、安井 明フェローとの本研究課題に関する議論・打ち合わせ等は、適宜、メールを中心に行った。

## [3] 成果

## (3-1) 研究成果

昨年度の研究で、Pol $\eta$  のデグロン予測から見出された D-BOX (xxRxxLxx) およびこの D-BOX と重なるように見出された aurora A kinase 認識配列 (R/K/N-R-x-S/T-B) について、保存性の高い重要なアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体 Pol $\eta$  (R234A/L237A: RA/LA および T236A: TA) を安定発現する U2OS 細胞を作製していた。各変異体の M/G1 期での発現は、野生型と比べて RA/LA 変異体で増加し、TA 変異体で減少したことから、Pol $\eta$  は D-BOX を介して APC/C の標的となり、aurora A kinase による T236 のリン酸化の制御を受ける可能性が示された。そこで、このような発現量の変動が細胞の紫外線感受性に及ぼす影響を調べた結果、どちらの変異体も、Pol $\eta$  欠損細胞の感受性を部分的に相補するにとどまり、TA 変異が RA/LA より僅かに強い感受性を示した (図 2)。

図2 Pol $\eta$  変異体発現細胞の紫外線感受性

これに対して、CDC20 と同様に APC/C の触媒活性を担う FZR1 を発現抑制すると、血清飢餓により同調した不死化ヒト網膜色素上皮細胞 hTERT-RPE1 における Polη の発現レベルが S/G2 期で明らかに減弱する結果が得られた (図3)。一方で、D-BOX が複数箇所見出される複製型 DNA ポリメラーゼ Polδ の触媒サブユニットや TLS ポリメラーゼの一つである Polκ ではそのような変動は認められなかった。

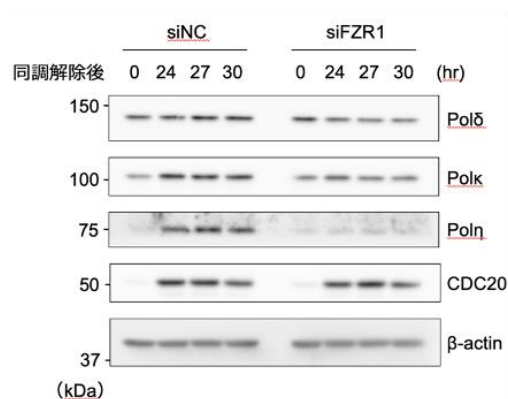


図3 FZR1 発現抑制が DNA ポリメラーゼの発現に与える影響

同様の傾向は非同調の細胞でも観察され、FZR1 の発現抑制が弱まるタイミングで Polη の発現レベルも回復することから、APC/C<sup>CDC20</sup> と APC/C<sup>FZR1</sup> が M/G1 期での Polη の発現レベルの制御において拮抗する可能性が考えられた (図4)。

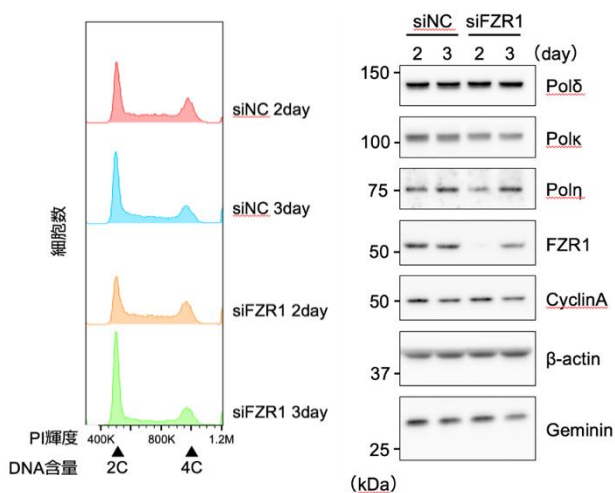


図4 非同調細胞における FZR1 発現抑制の影響

CDC20 と FZR1 が M/G1 期での Polη の発現レベル調節にどのように関わるかをより詳細に解析するためには、阻害剤や siRNA による発現抑制では限界がある。そこで、標的タンパク質の迅速な分解とその可逆性が知られるオーキシンデグロン法の導入を試

みた。まず、オーキシンの受容体であるイネ由来 OsTIR1 を安定発現する hTERT-RPE1 細胞を作製した。次に、この細胞に対して、CDC20 もしくは FZR1 タンパク質の C 末端にオーキシン誘導性タンパク質分解のデグロンである mini-AID 配列を融合させるためのゲノム改変用プラスミドを作製し、CRISPR-Cas9 を利用した部位特異的な導入を試みているが、残念ながら現在までに目的の細胞の確立には至っていない。

本研究により、S/G2 期で必要とされる Polη の安定性が細胞周期の M 期から G1 期にかけて APC/C<sup>CDC20</sup> 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。一方で、APC/C<sup>FZR1</sup> の関与については不明な点が多い。今後は迅速な標的タンパク質分解系と組み合わせることで、APC/C の関与をさらに明らかにしたい。

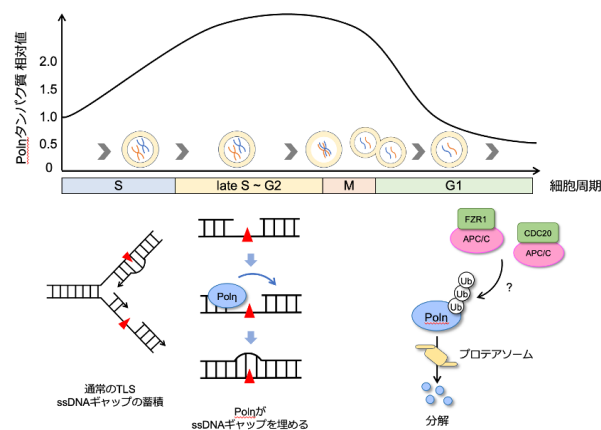


図5 細胞周期を通した Polη タンパク質の発現変動

### (3-2) 波及効果と発展性など

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に迫ることが今後の課題である。この研究を通して、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。将来的には、必要なタイミングでの TLS 活性の増強や不要な時期に TLS 活性を抑制する機構を人為的に調節・賦活化することで、ゲノム安定性をコントロールする技術の開発に結びつくことを目指している。

### [4] 成果資料

現時点で、研究成果は未発表である。