

## 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

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の一つとして、損傷乗り越えDNA合成(TLS)がある。TLSでは、損傷DNAを鋳型に直接DNA合成を行えるTLS型DNAポリメラーゼが働く。DNAポリメラーゼ・イータ(Pol $\eta$ )は、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TLSポリメラーゼである。色素性乾皮症バリエーション患者では、Pol $\eta$ の機能欠損により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が数千倍に上昇することからも、Pol $\eta$ の遺伝情報の維持における役割は極めて重要である。一方で、Pol $\eta$ は損傷のない鋳型に対する忠実度は非常に低いため、遺伝情報の安定性を維持する上で、その働きを損傷部位に限定させる機構も不可欠と言える。

TLSポリメラーゼは、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との相互作用を介して損傷部位に呼び込まれ、TLSが完了するとPCNAが脱ユビキチン化され、TLSポリメラーゼから複製型DNAポリメラーゼへの切り替えが起こる。一方で、紫外線依存的なPol $\eta$ のユビキチン化が知られ、ポリユビキチン化を介して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との結合に阻害的に作用することが報告されている。このように、Pol $\eta$ によるTLSの制御では、Pol $\eta$ とPCNAのユビキチン化状態の適切な調節が深く関わっている(図1)。

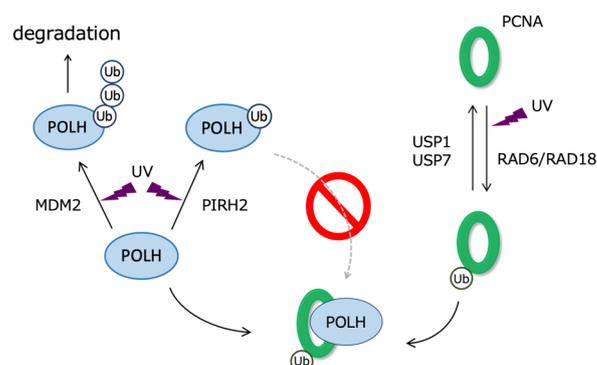


図1 Pol $\eta$ の関わるTLSにおけるユビキチン化修飾

本共同研究では、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を通して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とUSP34に着目し、Pol $\eta$ やPCNAのユビキチン化・脱ユビキチン化に関連したTLS制御機構での役割について理解を深めることを目的とした。なお、安井明フェローならびに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、メールを中心に行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

これまでに、Pol $\eta$ の発現量はG1期で減弱し、S期への移行によって増大すること、USP11の発現抑制がS期でのPol $\eta$ の発現量を低下させることを示した。一方で、Pol $\eta$ の発現調節については、断片的な知見はあるものの、細胞周期を通じたタンパク質の量的変動については情報が少ない。

そこで、Pol $\eta$ の脱ユビキチン化の重要性を理解する上で重要な基礎的知見として、細胞周期を通じたPol $\eta$ の発現変動の解析ならびにPol $\eta$ の分解に関わるユビキチンリガーゼの同定に向けた解析を行った。まず、血清飢餓による同調が容易な正常二倍体細胞であるhTERT-RPE1を用いて、同調解除から経時的に細胞を回収してPol $\eta$ のタンパク質レベルの変動を調べた。

ウエスタンブロットの結果、薬剤でG1期同調したがん細胞U2OSで得られた結果と同様に、同調24時

間後 (同調 24h) に Polη の発現量は大きく減弱した。そして、S 期を通して上昇した発現量は G2 期 (リリース 15-24h) で最大となり、M 期から G1 期 (リリース 27-30h) にかけて顕著に減弱した (図 2)。

フローサイトメトリー解析結果

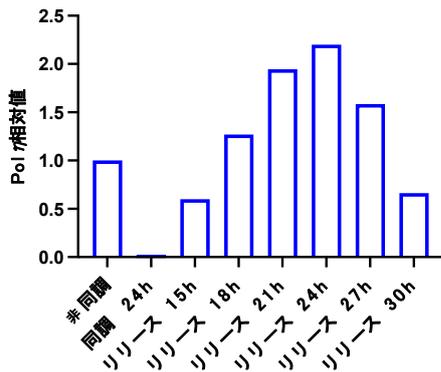
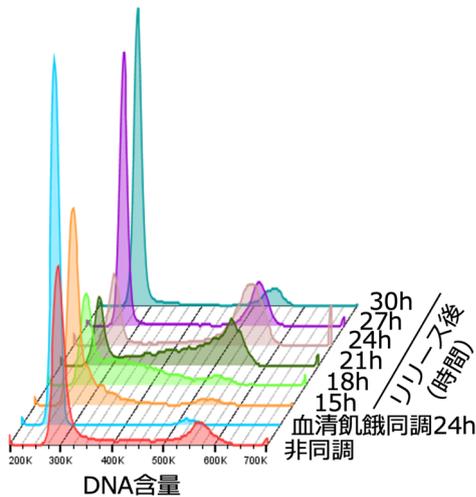


図 2. 同調解除後の細胞周期の進行 (上段) と Polη タンパク質の発現量 (下段)

次に、M 期から G1 期における Polη タンパク質量の低下に関わる経路を明らかにするため、26S プロテアソーム阻害剤である MG132 処理の影響を調べた (図 3)。その結果、同調解除後 24h から MG132 で 6 時間処理すると、30h の時点でも細胞周期の進行および Polη の発現量は同調解除後 24h と同程度であった。これは、M 期前期から中期の進行に重要な CDC20 を含む APC/C の活性が阻害され、細胞周期が M 期中期で停止した結果であると推測した。これに対して、同調解除後 27h から MG132 で 3 時間処理すると、細胞周期は MG132 未処理の同調解除後 27h と 30h の中間を示すにもかかわらず (データ未掲載)、Polη の発現量は最大レベルに達した。このことから、Polη は M 期中期以降から G1 期にかけてユビキチン依存的な経路で速やかに分解される可能性が示唆された。また、

M 期後期から G1 期にかけて働く CDH1 をサブユニットとする APC/C の認識配列が Polη のアミノ酸配列中に見出されることから、今後は時期特異的な Polη の不安定化における CDH1 の関与を初めとして、USP11 とのダブルノックダウンの効果などを解析する予定である。

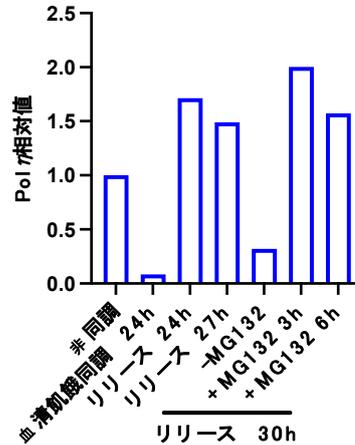


図 3. 同調解除後の Polη タンパク質の発現量における MG132 の効果

### (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、特に M 期後期から 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。今後、時期特異的な Polη の分解に関わる E3 リガーゼを特定することで、脱ユビキチン化酵素がどのように関わるかという本質的な問いに対する答えに近づけると考えている。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

### (1)

DNA ポリメラーゼ・イータの発現調節における脱ユビキチン化酵素 USP11 の関与  
中森晴渚、仲野由佳梨、案濟 萌、菅野新一郎、安井 明、酒井 恒、花岡文雄、菅澤 薫、横井雅幸  
第 46 回日本分子生物学会年会 (サイエンスピッチ、ポスター発表)

2023 年 12 月 8 日、神戸