

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12594

研究課題名(和文) ユビキチン化PCNAの新規脱ユビキチン酵素による複合的損傷トレランス経路選択機構

研究課題名(英文) Multiple mechanisms of post-replication repair pathway choice by deubiquitinases for ubiquitinated PCNA

研究代表者

増田 雄司 (MASUDA, Yuji)

名古屋大学・医学系研究科(環医)・准教授

研究者番号：30273866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：複製後修復機構として知られる損傷トレランス機構は、PCNAのユビキチン化によって制御される。モノユビキチン化PCNAは忠実度が低い損傷乗り越えDNA合成を、ポリユビキチン化PCNAは忠実度が高いtemplate switch経路を促進することから、その経路選択は遺伝的安定性の維持にとって極めて重要である。ところがヒト細胞ではポリユビキチン化PCNAがほとんど検出されず、その制御機構は不明な点が多い。本研究では、ユビキチン化PCNAの新規脱ユビキチン酵素を同定することによって、ヒトでの損傷トレランス制御機構を解析した。

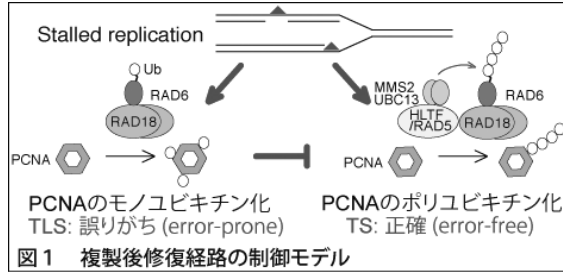
研究成果の概要(英文)：The DNA damage tolerance pathways as the post-replication repair are regulated by ubiquitination of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Since mono- and poly-ubiquitination of PCNA stimulates the error-prone pathway, translesion DNA synthesis (TLS), and the error-free, in principle, pathway, template switch (TS), respectively. However, in humans, the regulatory mechanism is obscure because poly-ubiquitinated PCNA is only slightly detectable. In this study, we identified deubiquitinases for ubiquitinated PCNA and analyzed their functions in the damage tolerance pathways.

研究分野：生化学

キーワード：損傷トレランス

1. 研究開始当初の背景

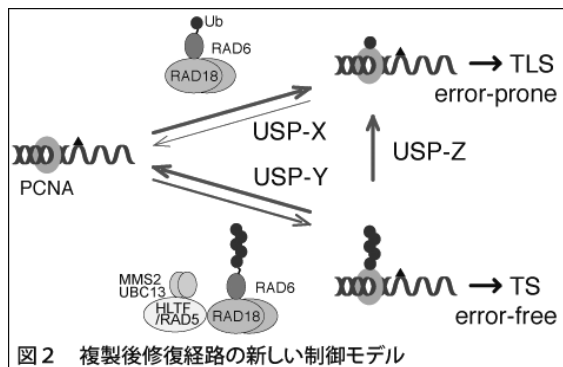
複製後修復 (post-replication repair, PRR) は損傷 DNA によって阻害された DNA 複製を再開する分子機構であり「損傷トレランス」として機能する。PRR には二つの副経路、損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA



synthesis, TLS) と、鋳型鎖交換反応を介した template switch (TS) 経路が存在する。TLS は DNA 合成の忠実度が低く error-prone (誤りがちな DNA 合成) である一方、TS は DNA 合成の忠実度が高く原理的に error-free (誤りのない DNA 合成) である。PRR は PCNA のユビキチン化により制御され、PCNA のモノユビキチン化は TLS (error-prone) を促進し、ポリユビキチン化は TS (error-free) を促進することから (図 1)、その制御は遺伝的安定性の維持にとって極めて重要である < 引用文献 >。

申請者はこれまでに *in vitro* の詳細な解析から、PCNA のモノユビキチン化は RAD6-RAD18₂ (E2-E3 三量体) が触媒し、ポリユビキチン化は RAD6-RAD18₂ と UBC13-MMS2 (E2-E2 パリアント二量体)、RAD5 [出芽酵母] / HLT [ヒト] (E3) が触媒することを示した (図 1) < 引用文献 >。ところがヒト細胞内では、PCNA のポリユビキチン化がほとんど検出されないことから、ヒトでのポリユビキチン化と TS (error-free) の制御機構の実態は不明な点が多く残されている。

従来、PRR 制御の分子機構は主に PCNA のユ



ビキチン化の側面から研究されてきた。酵母では PCNA のモノユビキチン化とポリユビキチン化による PRR の制御機構の概念が確立している。ところがヒト細胞では酵母とは異なり PCNA のポリユビキチン化がほとんど検出されない。申請者は、ヒト細胞で PCNA のポリユビキチン化が観察されない理由が、ヒトに特有な脱ユビキチン酵素群の関与による

ものではないかと考えた。酵母には知られていない脱ユビキチン過程を想定することにより、より厳密な PRR の制御が可能となる。この脱ユビキチン制御には原理的に 3 種類の脱ユビキチン酵素の関与が想定できる (図 2)。ここに示した USP-X はモノユビキチン化 PCNA からユビキチンを除去する酵素、USP-Y はポリユビキチン化 PCNA からポリユビキチン鎖を除去する酵素、USP-Z はポリユビキチン化 PCNA をモノユビキチン化 PCNA に変換する酵素である。これらの酵素群を想定することにより、PCNA のユビキチン化レベルを時空間特異的に厳密に制御することが可能になる。特に TS の実行には、必ず利用可能な新生娘鎖を必要とするので、その開始が厳密に制御されなければ、不完全な中間体を生じ染色体の不安定性を引き起こす。また、反復配列の多い高等真核生物にとっては、その反応過程自体が染色体再編成等の原因となり得るため、局所的に error-prone な TLS よりも TS の誤作動による染色体再編成のリスクの方が高いのかもしれない。したがって、TS を開始する時空間の厳密な制御は、染色体の安定性維持に極めて重要である。おそらく高等真核生物ではそのような制御機構の帰結として、つまり USP-Y と USP-Z が強く働くことによって、ポリユビキチン化 PCNA が観察できないのではないかと推測した。

しかしながら現在までに、PCNA の脱ユビキチン酵素の報告はほとんどなく、ここで提示したような斬新な酵素群の存在は不明である。脊椎動物では USP1 < 引用文献 > と USP7 < 引用文献 > がユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン酵素として報告されているが、ポリユビキチン化 PCNA に対してどの様に作用するかは明らかでない。したがって、本申請研究が目指す、ユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン酵素群の同定と解析は非常にチャレンジ性が高い。特に、USP-Z (変換酵素) に相当する酵素については、その概念自体が全く新しく、これらの酵素の発見は、当該研究分野だけではなく、ユビキチン関連の分子生物学分野全体に強いインパクトを与えることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、新規の PCNA の脱ユビキチン酵素を同定、解析することによって、ヒトでの損傷トレランス制御機構の解明を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究では、想定される脱ユビキチン酵素の活性を HeLa 細胞の抽出液中から検索する。実際に本研究手法を使った当研究室の研究により USP7 が同定されている < 引用文献 >。

(1) 本申請研究では、ユビキチン化 PCNA を基質とする様々なタイプの脱ユビキチン酵素活性を区別しての測定する必要がある。

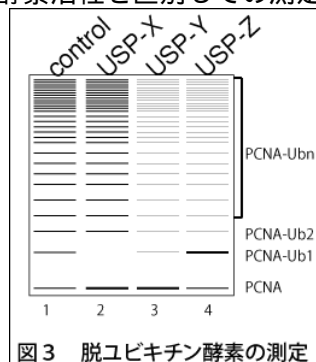


図3 脱ユビキチン酵素の測定

そこで本研究では、これまでに申請者が開発した、「活性測定の基質として様々な長さのユビキチン鎖が結合したPCNAを利用する」アッセイ系を利用した

(未発表)。図3は本実験で使用するために作製した基質PCNA(レーン1)と各脱ユビキチン酵素との反応産物の予想される結果(レーン2-4)を表している。モノユビキチン化PCNA(PCNA-Ub₁)からユビキチンを除去する酵素(USP-X)との反応では、PCNA-Ub₁の選択的な減少と、それに付随して未修飾のPCNAの増加が期待される(レーン2)。ポリユビキチン化PCNAからポリユビキチン鎖を除去する酵素(USP-Y)との反応では、ポリユビキチン化PCNAの様な減少とそれに付随して未修飾のPCNAの増加が期待される(レーン3)。ポリユビキチン化PCNAをモノユビキチン化PCNAに変換する酵素(USP-Z、変換酵素)との反応では、ポリユビキチン化PCNAの様な減少とそれに付随してPCNA-Ub₁の選択的な増加が期待される(レーン4)。このアッセイ系を利用することにより、一つの条件でそれぞれの酵素活性の選択的な測定が可能である。基質PCNAの作製は、申請者の先行研究<引用文献>に従った。

(2) 新規脱ユビキチン酵素の検出

まず、HeLa細胞の抽出液をphosphocelluloseカラムで粗分画し、非結合分画(100 mM KCl、P1)と結合分画(420 mM KCl、P2)を得た。これを前述のPCNAの脱ユビキチン反応系に添加し、脱ユビキチン活性を測定した。活性が検出された画分について段階的なカラムクロマトグラフィーによってさらに精製を進めた。

(3) 酵素活性に寄与するタンパク質を同定するために精製の最終段階の画分をゲル電気泳動で分離し、質量分析を行った。質量分析によって得られた情報をもとに、候補遺伝子をクローニングした。

(4) 候補遺伝子から組換えタンパク質を精製しユビキチン化PCNAの脱ユビキチン反応を解析した。

(5) siRNAを用いて候補遺伝子の発現を抑制し、候補遺伝子の機能解析を行った。

(6) Crisper-Cas9システムを用いて候補遺伝子を破壊し、候補遺伝子の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) これまでの研究から、ユビキチン化PCNAを基質とする脱ユビキチン酵素としてUSP7に加えて、さらに2つの酵素を同定した。本研究では、USP1は同定されなかった。酵素活性の精製を進め、候補遺伝子を特定した。

(2) 組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製タンパク質標品を得た。組み換えタンパク質がHeLa細胞の抽出液中から精製した酵素と同等の活性を示したことから、同定した遺伝子が目的の酵素をコードするものと結論した。

(3) 特定した遺伝子を培養細胞でknock downし、生理的機能の解析を行った。また、Crisper-Cas9システムを用いて候補遺伝子を破壊した細胞株を樹立し、生理的機能の解析を行った。その結果、これらの細胞は、紫外線感受性、放射線感受性等に異常が観察された。また、PCNAのユビキチン化レベルにも変化が観察されたことから、これらの酵素がユビキチン化PCNAの制御に寄与する可能性が示唆された。

<引用文献>

Masuda Y*#, Suzuki M#, Kawai H, Hishiki A, Hashimoto H, Masutani C, Hishida T, Suzuki F, Kamiya K*. *En bloc* transfer of poly-ubiquitin chains to PCNA in vitro is mediated by two different human E2-E3 pairs. **Nucleic Acids Res.** 40:10394-10407. 2012. (#: co-first author)

Masuda Y*, Suzuki M, Kawai H, Suzuki F, Kamiya K. Asymmetric nature of two subunits of RAD18, a RING-type ubiquitin ligase E3, in the human RAD6A-RAD18 ternary complex. **Nucleic Acids Res.** 40:1065-1076. 2012.

Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Haas W, Gygi SP, Ploegh HL, Bernards R, D'Andrea AD. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. **Nat. Cell Biol.** 8:339-347. 2006.

Kashiwaba S#, Kanao R#, Masuda Y#, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masutani C*. USP7 Is a Suppressor of PCNA Ubiquitination and Oxidative-Stress-Induced Mutagenesis in Human Cells. **Cell Rep.** 13:2072-80. 2015 (#: co-first author)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva EK, *Kamiya K. Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level. **Carcinogenesis**. 2017; 38, 570-578. doi: 10.1093/carcin/bgw208

〔学会発表〕(計 9 件)

Masutani C, Kashiwaba S, Kanao R, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masuda Y. USP7 suppresses H2O2-induced mutagenesis by regulating PCNA ubiquitination in human cells. Gordon Research Conference, Mutagenesis, 2016.6, Girona, Spain.

益谷央豪, 金尾梨絵, 柏葉脩一郎, 松尾(楠本)理加, 増田雄司. PCNA の翻訳後修飾の可逆的な制御による突然変異抑制機構の解析. 日本放射線影響学会第 59 回大会, 2016.10, 広島.

Kanao R, Kashiwaba S, Masuda Y, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masutani C. Suppression of PCNA ubiquitination and oxidative stress-induced mutagenesis by USP7. The 10th 3R (Replication, Recombination and Repair) symposium, 2016.11, Matsue.

金尾梨絵, 増田雄司, 益谷央豪. PCNA の翻訳後修飾が制御する DNA 損傷トレランスの解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.12, 横浜.

益谷央豪, 柏葉脩一郎, 金尾梨絵, 楠本理加, 花岡文雄, 増田雄司. USP7 は PCNA のユビキチン化を制御して酸化 DNA 損傷による突然変異を抑制する. 第 34 回染色体ワークショップ/第 15 回核ダイナミクス研究会, 2017.1, 木更津.

Masuda Y, Saeki Y, Yanaka S, Kawai H, Kukimoto I, Kato K, Tanaka K, Masutani C. Mechanism of multiple lysine 48-linked ubiquitin chain synthesis by E6AP.

FASEB Science Research Conference, UBIQUITIN & CELLULAR REGULATION, 2016.6, Montana, U.S.A.

増田雄司, 金尾梨絵, 益谷央豪. 紫外線損傷乗り越え DNA 合成における DNA ポリメラーゼの制御機構. 日本環境変異原学会第 46 回大会, 2017 年 11 月 6 - 7 日. 東京

増田雄司, 益谷央豪. ユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン化酵素として機能するヒト USP7 の作用機序. 日本放射線影響学会第 60 回大会. 2017. 10. 25-28. 千葉

益谷央豪, 金尾梨絵, 松尾(楠本)理加, 増田雄司. ゲノムの安定化と不安定化をもたらす損傷乗り越え DNA 複製の制御機構の解析. ワークショップ「加齢関連疾患の発生と治療に関わる DNA 損傷と細胞老化」. ConBio2017/第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp>

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genome/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 雄司 (MASUDA, Yuji)
名古屋大学環境医学研究所・准教授
研究者番号: 30273866

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし