

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550024

研究課題名(和文) PCNAの新規脱ユビキチン酵素群の同定と複製後修復経路の多重制御メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of multiple regulation of post-replication repair pathway by deubiquitinases

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト損傷トレランス機構には、忠実度が低い損傷乗り越えDNA合成と、忠実度が高い鋳型鎖交換反応を介したtemplate switch経路が存在する。それぞれの経路はPCNAのモノまたはポリユビキチン化によって制御されることから、そのメカニズム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ないため、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を基質とする脱ユビキチン酵素を同定し、PCNAの脱ユビキチンの側面から、ヒトでの損傷トレランス制御機構の解析を行った。

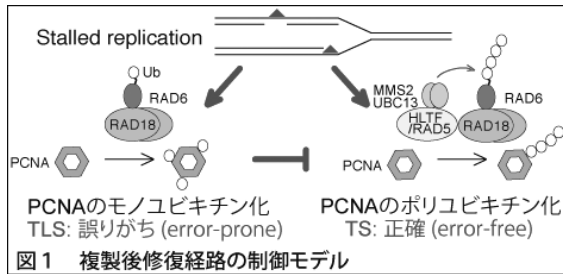
研究成果の概要(英文)：In humans, cells have two damage tolerance pathways. One is the error-prone pathway, translesion DNA synthesis (TLS). The other is the error-free, in principle, pathway, template switch (TS). These are regulated by ubiquitination of PCNA. Since mono- and poly-ubiquitination of PCNA stimulates TLS and TS, respectively, the regulation of pathway choice is a crucial step for the maintenance of genetic stability. 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 function in the damage tolerance pathways.

研究分野：生化学

キーワード：DNA損傷トレランス

1. 研究開始当初の背景

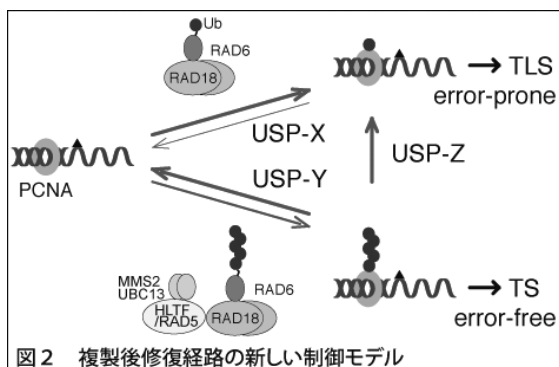
複製後修復(post-replication repair, PRR)は損傷 DNA によって阻害された DNA 複製を再開する分子機構であり「損傷トレラン



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である一方、TSはDNA合成の忠実度が高く原理的に error-free 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。

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-RAD18<sub>2</sub>(E2-E3三量体)が触媒し、ポリユビキチン化はRAD6-RAD18<sub>2</sub>とUBC13-MMS2(E2-E2バリエーション二量体)、RAD5[出芽酵母]/HLTF[ヒト](E3)が触媒することを示した(図1)。ところがヒト細胞は酵母とは異なり、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かった。

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ため、ヒトでの PRR の制御機構は不明な点が多い。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 がユビキチン化 PCNA の唯一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

本申請研究では、ヒトの PRR を制御することが期待される全く新しい酵素活性を同定し、その生物学的機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、想定される斬新な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。

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。そこで、

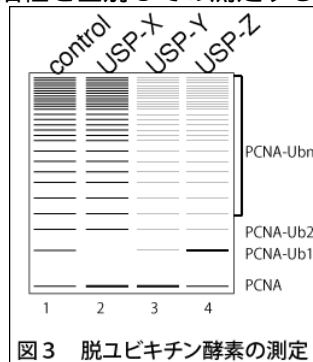


図3 脱ユビキチン酵素の測定

で、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 を利用する新たなアクセシ系を開発する。図 3 は本実験で使用するために作製する基質

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-Ub<sub>1</sub>) からユビキチンを除去する酵素 (USP-X) との反応では、PCNA-Ub<sub>1</sub> 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 の一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 の一様な減少とそれに付随して PCNA-Ub<sub>1</sub> の選択的な増加が期待される (レーン 4)。このアクセシ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となる。基質 PCNA の作製は、申請者の先行研究 (Masuda et al., NAR 2012) に従って行う。

#### 4. 研究成果

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、予備的な解析を行ったところ、HeLa 細胞抽出液中にユビキチン化 PCNA を基質とする、脱ユビキチン酵素活性を見いだした。

そこでまずは、HeLa 細胞の抽出液を陽イオン交換カラムで粗分画した。さらに、8 段階のステップを経て、部分精製品を得た。最終段階のカラムから溶出した各フラクションの酵素活性を測定した結果、二種類の活性が検出された。

次に、これらの酵素活性に寄与するタンパク質を同定するために部分精製品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。

候補遺伝子が実際にユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン反応に関与しているかを確かめるため、大腸菌から組換えタンパク質を精製した。この組換えタンパク質は、HeLa 細胞の抽出液から精製した酵素活性と同様の活

性を示したことから、この遺伝子が、ユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン反応を触媒するタンパク質をコードしていると結論した。

次に、細胞内でのこれらの遺伝子の機能がユビキチン化 PCNA の脱ユビキチン反応に関与しているかを調べるために、siRNA を用いて細胞内の遺伝子発現を抑制した。その結果、PCNA のユビキチン化の状態に変化が観察された。培養細胞を使った実験から、この遺伝子機能が、細胞の紫外線耐性に寄与していることも観察された。

#### 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)

Kashiwaba S<sup>#</sup>, Kanao R<sup>#</sup>, Masuda Y<sup>#</sup>, 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) 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.014

[学会発表](計 9 件)

金尾梨絵、柏葉脩一郎、増田雄司、松尾(楠本)理加、花岡文雄、益谷央豪: PCNA のモノユビキチン化の制御によるヒト細胞での酸化的 DNA 損傷誘発突然変異抑制機構. 日本薬学会 第 136 年会, 2016. 3.26-29. パシフィコ横浜 (横浜)

益谷央豪、柏葉脩一郎、金尾梨絵、松尾(楠本)理加、花岡文雄、増田雄司: PCNA のユビキチン化を制御して過酸化水素誘発突然変異を抑制するヒト細胞のメカニズム. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015.12.1-4. 神戸ポートアイランド (神戸)

増田雄司、柊元巖、益谷央豪: HECT タイプユビキチンリガーゼによる K48 ユビキチン鎖合成の分子機構. 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015.12.1-4. 神戸ポートアイランド (神戸)

金尾梨絵、柏葉脩一郎、増田雄司、松尾(楠本)理加、花岡文雄、益谷央豪: 酸化損傷によって誘導される PCNA のモノユビキチン化を制御する新規メカニズムの解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015.10.19-21. 焼津グランドホテル (焼津)

Kanao R, Masuda Y, Hanaoka F, Masutani C: Regulation of DNA damage tolerance by simultaneous mono-ubiquitinations of multiple-units of PCNA in human cells. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015.10.8-10. 名古屋国際会議場 (名古屋)

屋)

Masuda Y, Kukimoto I, Masutani C :  
Mechanism of Lysine 48-linked  
Multiple Ubiquitin Chain Synthesis  
by an HECT Ubiquitin Ligase. EMBO  
Conference on Ubiquitin and  
ubiquitin-like modifiers: From  
molecular mechanisms to human  
diseases, 2015.9.18-22. HOTEL CROATIA  
CAVTAT (Cavtat, Croatia)

増田雄司, 柊元 巖, 益谷央豪: HECT タ  
イプのユビキチンリガーゼ、E6AP-E6 複  
合体によるユビキチン鎖伸長反応の分  
子機構. 第35回日本分子生物学会年会,  
2014.11.25-27. パシフィコ横浜(横浜)

増田雄司: ユビキチンリガーゼによる  
ユビキチン鎖リンケージとユビキチン  
鎖の伸長制御. 国立遺伝学研究所研究  
集会「染色体DNAの安定維持の分子メ  
カニズム」, 2014.11.6-7. (三島)

増田雄司, 益谷央豪: PCNA のユビキチ  
ン修飾による複製後修復経路の制御.  
変異機構研究会・第27回夏の学校, 2014.  
6.21-22 (名古屋)

〔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

<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・医学系研究科(環医)・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