



DDB2の翻訳後修飾を介したゲノム損傷応答ネットワーク制御

松本, 翔太

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2015-09-25

(Date of Publication)

2017-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6497号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006497>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏名 松本 翔太

専攻 生物学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

DDB2 の翻訳後修飾を介したゲノム損傷応答ネットワーク制御

指導教員 菅澤 薫

哺乳類のヌクレオチド除去修復 (NER) において、紫外線により DNA 損傷が生じると、まず DDB1-DDB2 複合体 (UV-DDB) が損傷を認識して結合した後、NER 反応の開始に必須である XPC 複合体がリクルートされる。一方、UV-DDB は細胞内で CUL4 ユビキチンリガーゼと複合体を形成しており、紫外線照射に伴って DDB2 と XPC がポリユビキチン化される。無細胞系において DDB2 がポリユビキチン化されると DNA 損傷結合能が失われる一方、ユビキチン化 XPC は損傷結合能を保持するため、ユビキチン化を介した DDB2 から XPC への損傷受け渡しモデルが提唱されている。その後、DDB2 はプロテアソームにより分解される一方、XPC は脱ユビキチン化を受けるが、DDB2 の分解や XPC の可逆的ユビキチン化の生物学的意義については不明な点が多く残されている。

本研究ではさまざまな変異 DDB2 をヒト正常線維芽細胞において安定発現することにより、DDB2 の N 末端領域の欠失およびリジン残基の変異が、DNA 修復活性とは独立して細胞の紫外線感受性に影響を与えることを見出した。変異 DDB2 の細胞内動態を調べた結果から、N 末端領域に存在する 7 か所のリジン残基が、プロテアソームに依存した DDB2 の紫外線誘導性分解に必要であることがわかった。精製タンパク質を用いて再構成した試験管内ユビキチン化反応系により、これら 7 か所のリジン残基が DDB2 におけるユビキチン化の主な標的であることを確かめるとともに、C 末端側の β -プロペラ領域においても少なくとも 5 か所のリジン残基がユビキチン化されうることを見出した。N 末端領域の 7 か所のリジン残基に加えて、同定された β -プロペラ領域のリジン残基をさらにアルギニンに置換することで、ユビキチン化抵抗性の変異 DDB2 を作成し、これをヒト正常線維芽細胞内で安定発現したところ、紫外線誘発 DNA 損傷の修復に遅延が見られた。

一方、紫外線照射に伴う内在性 DDB2 タンパク質の動態を改めて調べたところ、正常細胞と比較して XPC 欠損細胞における DDB2 の紫外線誘導性分解が有意に速いことを見出した。XPC 欠損細胞における DDB2 の分解は、野生型 XPC タンパク質の発現レベルに依存して抑制されることから、XPC が DDB2 の紫外線誘導性分解を負に制御していることが示された。さらに、試験管内ユビキチン化反応系を用いた実験から、XPC が DDB2 のユビキチン化を競合的に阻害することがわかった。以上の結果から、XPC が適切に損傷部位へリクルートされれば、XPC が優先的にユビキチン化の標的となることで DDB2 は分解を免れ、これにより新たな DNA 損傷を認識して修復反応を開始できるのではないかと考えている。

松本 翔太 NO. 2

DDB2 が何らかの因子との相互作用を介して紫外線に対する細胞応答に関わっている可能性を考え、二重タグを融合した DDB2 を安定発現する HeLa 細胞抽出液から、タグを利用したアフィニティクロマトグラフィーによりタンパク質複合体を単離・精製した。複合体構成成分の質量分析の結果より、DDB2 相互作用因子として RUVBL2 と PKM2 を含む多数の因子を同定した。siRNA を用いて RUVBL2 を発現抑制したところ、細胞が紫外線感受性を示すとともに、紫外線誘発 DNA 損傷の修復速度に低下が見られた。RUVBL2 はさまざまなクロマチンリモデリング複合体のサブユニットとして機能することが報告されており、DDB2 が RUVBL2 を介して損傷部位周辺のヌクレオソームの状態を変化させることで、NER 反応の促進に寄与している可能性が考えられる。

氏名	松本 翔太		
論文 題目	DDB2 の翻訳後修飾を介したゲノム損傷応答ネットワーク制御		
審査 委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	菅澤 薫
	副査	教授	坂本 博
	副査	教授	前川 昌平
	副査	准教授	影山 裕二
			印
要 旨			
<p>ゲノム DNA は、さまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けている。鋳型 DNA 鎖の損傷により DNA 複製や転写が妨害されると、突然変異や染色体異常、細胞死などが誘導され、種々の疾患の発症につながる可能性がある。このような弊害に対する生体防御機構として、生物は複数の DNA 修復機構を進化の過程で獲得してきた。中でも、ヌクレオチド除去修復 (NER) は紫外線や化学変異原によって発生する多様な塩基損傷を対象とし、その遺伝的欠損が皮膚がんの好発を特徴とする色素性乾皮症 (XP) を引き起こすことから、発がんに対する防御機構としての重要性が広く認識されている。</p> <p>哺乳類 NER においては、XP 責任遺伝子産物の一つである XPC を含むヘテロ三量体 (XPC 複合体) が DNA 二重らせん構造の歪みを認識することでさまざまな損傷部位に結合し、その後の修復反応の開始に必須な役割を担っている。同じく XP 責任遺伝子産物である DDB2 は、DDB1 と共に UV-DDB と呼ばれる複合体を形成し、特に紫外線によって特異的に誘発されるシクロプタン型ピリミジン二量体 (CPD) やピリミジン-ピリミドン (6-4) 光産物 (6-4PP) を効率よく認識して XPC の損傷部位への呼び込みを促進する。近年、UV-DDB は CUL4-RBX1 と結合してユビキチンリガーゼ (CRL4^{DDB2}) として機能し、DNA 損傷部位において DDB2、XPC、ヒストンなど、さまざまなタンパク質をユビキチン化することが示された。特に、試験管内においてポリユビキチン化された DDB2 が損傷 DNA 結合活性を失うことから、ユビキチン化を介した UV-DDB から XPC への損傷受け渡しモデルが提唱されている。一方、ポリユビキチン化された DDB2 がプロテアソームにより分解されるのに対して、XPC のユビキチン化は可逆的であることが報告されており、これらの翻訳後修飾の生物学的意義については不明な点が多く残されていた。発がんに対する防御機構としての NER において律速となる DNA 損傷認識段階の制御機構を詳細に解明することは、基礎生物学だけでなく医学的にも大変重要な課題であると言える。</p> <p>本学位論文は第一部及び第二部により構成され、第一部では DDB2 における翻訳後修飾の標的的部位であるリジン残基の役割とユビキチン化の制御に関して解析がなされている。試験管内において DDB2 がヒストンアセチル化酵素 CBP/p300 により直接アセチル化されるという先行研究の知見に基づき、DDB2 の N 末端テール領域に存在する 7 か所のリジン残基に着目した。この N 末端テール領域の欠失、あるいはリジン残基のアミノ酸置換を導入した変異 DDB2 をヒト正常線維芽細胞で安定発現することにより、細胞の紫外線感受性がさまざまに変化することが見出された。この時、CPD や 6-4PP の修復速度には DDB2 変異体間で有意な差が見られないことから、DDB2 が N 末端テール領域の翻訳後修飾を介し、NER とは独立した機能として細胞の紫外線応答を制御している可能性が強く示唆された。次に、紫外線処理した細胞におけるそれぞれの変異 DDB2 の経時的な挙動が、ウェスタンブロット解析により調べられた。その結果、N 末端テール領域の 7 か所のリジン残基をすべて失った DDB2 は、紫外線誘導性のタンパク質分解に対してほぼ完全に抵抗性となることが示された。パキュロウイルス発現系を用いて調製した組換え CRL4^{DDB2} 複合体により再構成した無細胞ユビキチン化反応系において、実際に N 末端テール領域がユビキチン化の主要な標的であることが生化学的に裏付けられた。</p>			

氏名	松本 翔太
<p>続いて DDB2 の紫外線誘導性のユビキチン化と分解の制御における XPC の役割について解析が行われた。紫外線処理した細胞内での内在性 DDB2 の動態解析から、XPC 欠損細胞における DDB2 の紫外線誘導性分解が、正常細胞と比較して有意に亢進していることが見出された。この XPC 欠損細胞に野生型 XPC 遺伝子を導入・発現して相補することで DDB2 は安定化し、しかもこの効果は XPC タンパク質の発現レベルに依存することから、細胞内において XPC が DDB2 の紫外線誘導性分解を負に制御することが証明された。さらに無細胞ユビキチン化反応系に XPC を添加すると用量依存的に DDB2 のポリユビキチン化が抑制されること、細胞内、試験管内いずれにおいても DDB2 のユビキチン化及び分解の抑制には XPC の DNA 結合活性が重要であることが示された。以上の結果から、XPC が DNA 損傷部位においてユビキチンリガーゼを競合することにより、DDB2 をユビキチン化及び分解から保護している可能性が強く示唆された。</p> <p>細胞が紫外線に曝された場合、DDB2 は複数の DNA 損傷を次々に認識して XPC を呼び込み、NER を開始することが期待される。にもかかわらず、紫外線照射に伴ってなぜ DDB2 が分解される必要があるのか、長い間謎であった。本研究の結果は、XPC が損傷部位に適切に呼び込まれれば DDB2 は分解を免れ、次の損傷認識が可能になることを示唆しており、紫外線照射時に細胞の NER 活性を維持するための新たな分子機構を解明したのもとして重要な意義があると認められる。</p> <p>第一部で DDB2 が NER とは独立して細胞の紫外線応答を制御することが示唆されたことを受け、第二部では DDB2 と相互作用する新たなタンパク質因子の探索が行われた。HA-FLAG 二重タグを融合した野生型 DDB2 または N 末端テール領域に変異を持つ DDB2 を安定発現する HeLa 細胞の抽出液から、タンデムアフィニティクロマトグラフィーにより複合体を精製し、質量分析により構成成分の同定を行った。その結果、すべての DDB2 と共通して相互作用する因子として、PKM2 及び RUVBL2 が同定された。ピルビン酸キナーゼ PKM2 は解糖系律速酵素として知られているが、プロテインキナーゼとしても働き、STAT3 等のリン酸化を介してアポトーシス制御に関わることが報告されている。一方、バクテリアの相同組換えに関わる RuvB ヘリカーゼのホモログである RUVBL2 は、RUVBL1 とともに INO80 をはじめとするさまざまなクロマチンリモデリング因子複合体を構成する。このうち、siRNA を用いて RUVBL2 の発現抑制を行ったところ、細胞の紫外線感受性の増強及び紫外線誘発 DNA 損傷の修復遅延が見られた。UV-DDB はヌクレオソームコアの内部に生じた 6-4PP や CPD に対しても結合活性を示すのに対して、XPC による DNA 損傷認識はヌクレオソーム構造の形成により強く阻害されることが無細胞系を用いた先行研究により示されている。特に、6-4PP よりも DDB2 に対する依存度が高い CPD の修復において RUVBL2 発現抑制の影響がより顕著に見られたことから、DNA 損傷部位に結合した UV-DDB が RUVBL2 を含むクロマチンリモデリング因子複合体を呼び込み、周辺のクロマチン構造を XPC がアクセス可能な状態に変換している可能性が考えられる。NER や細胞の紫外線応答の制御における PKM2 及び RUVBL2 の機能をより詳細に解明するとともに、DDB2 の N 末端テール領域における翻訳後修飾を特異的に認識する相互作用因子についても今後の検討が期待される。</p> <p>本研究は紫外線誘発 DNA 損傷の認識に関わる DDB2 タンパク質について、特に翻訳後修飾やタンパク質間相互作用の機能を中心に研究したものであり、DDB2 による NER や紫外線に対する細胞応答の制御、さらには紫外線による発がんの抑制に寄与する分子機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の松本翔太は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。</p>	