The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	紫外線により誘発される突然変異において損傷乗り越えDNA合成ポリメラーゼ・イータおよびイオタがマウス皮膚細胞および組織で果たす役割
Author(s)	櫻井, 靖高
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34587
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕

紫外線により誘発される突然変異において損傷乗り越えDNA合成ポリメラーゼ・イータおよびイオタがマウス皮膚細胞および組織で果たす役割

学位申請者　　櫻井　靖高

遺伝情報を担うDNAは安定に維持されなければならないが、様々な要因によって絶えず損傷を受けている。DNA損傷から遺伝情報を守るために、生物は多様な防御機構を獲得してきた。その一つである損傷乗り越え複製(TLS)機構は、複製ポリメラーゼが損傷部位で停止した場合、損傷を含む鋳型に対して塩基を重合できる特殊なポリメラーゼ(TLSポリメラーゼ)に一時的に置き換わり複製を継続する機構である。TLSに異常のある疾患として、日光過敏症と高発癌性を示す色素性乾皮症バリアント群(XP-V)がある。その責任遺伝子産物であるDNAポリメラーゼ・イータ(Polη)は、主な紫外線損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジン二量体を効率よく正確に乗り越えて複製することができる。PolηのパラログであるPolιは、紫外線損傷に対してヌクレオチドを取り込む活性を持っているが、生理的役割がよく分かっていなかった。我々のグループは、紫外線照射によりPolη欠損マウスは皮膚の上皮性組織に、Polι欠損マウスは皮膚の間葉系組織に腫瘍を形成することから、PolηとPolιはそれぞれの組織において紫外線による腫瘍の発生を抑制することを明らかにしてきた。

私は、PolηとPolιの欠損マウスで腫瘍の発生部位が異なることに着目し、マウスの組織・細胞レベルでのPolηとPolιの機能と制御を明らかにすることを目的に研究を行った。紫外線照射により生じた皮膚腫瘍における*p53*遺伝子上の突然変異を解析したところ、上皮性組織ではPolηが、また間葉系組織ではPolιが紫外線による突然変異の抑制を担っており、上皮性組織におけるPolιおよび間葉系組織におけるPolηは突然変異の誘発と抑制の両方に関与していた。また、上皮性組織と間葉系組織においてPolηとPolιの両方を欠損すると、特定の突然変異が増加することから、この変異の誘発には同一のポリメラーゼあるいはメカニズムが働いている可能性が示唆された。

このようなTLSポリメラーゼの使い分けがどのように制御されているのかを調べるために、マウスの皮膚由来の表皮細胞と真皮細胞を樹立した。紫外線感受性を解析したところ、野生型真皮細胞は野生型表皮細胞よりも強い感受性を示すものの、Polη欠損表皮細胞とPolη欠損真皮細胞は同程度の高い感受性を示した。一方、siRNAを用いたPolιの発現抑制は、紫外線感受性には影響がなかった。さらに、紫外線損傷を持たせたプラスミドを細胞に導入し、その複製産物を解析したところPolη欠損による突然変異頻度の上昇が表皮細胞では2.30倍であるのに対して真皮細胞では1.37倍であった。また、Polη欠損真皮細胞にPolηを相補すると紫外線感受性が野生型真皮細胞と同程度にまで回復し、突然変異頻度も抑えられた。このことから、紫外線感受性の抑制にはPolηによる効率の良いTLS反応が表皮細胞と真皮細胞の両細胞において必要であることが分かった。そして、突然変異頻度の抑制にはPolηによる正確なTLS反応が必要であり、表皮細胞の方が真皮細胞よりもPolηに対する依存度は高いことが分かった。

表皮細胞と真皮細胞の紫外線感受性の差異が何に起因するのかを調べるため、紫外線の除去効率を調べたところ、真皮細胞は表皮細胞よりも紫外線損傷の修復能力は低いことが分かった。また、カフェインを添加すると野生型真皮細胞とPolη欠損皮膚細胞(表皮および真皮細胞)で紫外線感受性が顕著に増大した。カフェインの添加による紫外線感受性の亢進はXP-V細胞の特徴であり、ヌクレオチド除去修復の機構に異常のある細胞ではほとんど見られない。したがって、表皮細胞と真皮細胞との間でPolηが関与するTLS反応に何らかの差異が生じている可能性を考え、紫外線照射後のPolηの挙動を調べた。紫外線照射後にPolηのタンパク質量が紫外線量依存的かつ継時的に減少しており、その程度は表皮細胞よりも真皮細胞においてより顕著に見られた。このPolηのタンパク質量の減少は、プロテアソーム阻害剤であるMG-132の添加により抑えられたことから、プロテアソームを介したタンパク質分解によるものであることが分かった。表皮細胞よりも真皮細胞の方がMG-132の効果が顕著であることから、紫外線照射によるPolηの分解は表皮細胞よりも真皮細胞においてより顕著であることが分かった。一方、Polηの対照としてPolιのタンパク質量を調べたところ、表皮細胞と真皮細胞の両細胞で紫外線照射による変動は見られなかった。

このPolηの分解が細胞内のTLS反応に影響を及ぼし得るかを調べるため、マウス皮膚細胞内のPolηとその対照としてPolιの分子数を定量した。表皮細胞と真皮細胞でPolηとPolιの分子数に差は見られず、PolηとPolιは一細胞当たりそれぞれ$6x10^5$と$2.5x10^5$分子存在することが分かった。紫外線照射後のPolηとPolιの量的変動を定量し分子数に

換算した結果、紫外線照射後に表皮細胞ではPolηの分子数が若干減少するものの、Polιよりも多くの分子が細胞内に存在することが分かった。一方、真皮細胞ではPolηが大きく減少した結果、照射後9時間以降でPolηの分子数がPolιよりも下回ることが分かった。このことから、Polηの顕著な分解により細胞内のPolηとPolιの量的バランスの変化をもたらす可能性が示唆された。

真皮細胞においてPolηとPolιの量的バランスの変化により、PolιがPolηに代わって紫外線損傷に対するTLSに寄与している可能性を調べるため、真皮細胞にPolιを過剰発現させた。Polιの過剰発現は真皮細胞において紫外線感受性に影響を与えなかったが、Polη欠損細胞において紫外線損傷による突然変異頻度を抑制したことから、Polιは真皮由来細胞では突然変異の抑制に機能していることが明らかとなった。

以上のことから、表皮ではPolηは紫外線照射に対する細胞の生存と突然変異の抑制に必要であり、Polηを欠損すると突然変異が蓄積し、腫瘍の形成が促進すると考えられる。一方、真皮においてもPolηは紫外線照射に対する細胞の生存には必要だが、突然変異の抑制に対してPolηは表皮ほど重要ではないと考えられる。真皮細胞では紫外線照射によりPolηが顕著に分解することと、Polιを過剰発現させることで突然変異頻度が抑制されたこととを併せて考えると、真皮では紫外線照射後にPolηを積極的に分解しPolιによるTLSを誘発することで突然変異を抑制し、腫瘍の形成を防いでいると考えられる。したがって、表皮とは異なり真皮では紫外線照射後のPolηの量的変化によりPolιをはじめとした他のポリメラーゼをTLSに動員し、突然変異を抑制する機構の存在を新たに見出した。本研究により、組織部位で紫外線損傷に対するTLS機構が異なる可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　櫻井　靖高　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　招へい教授	花岡　文雄
	副 査　教授	八木　健
	副 査　特任教授	田中　亀代次

論文審査の結果の要旨

DNA損傷から遺伝情報を守るために、生物は多様な防御機構を獲得してきた。その一つである損傷乗り越え複製(translesion synthesis; TLS)機構は、複製ポリメラーゼが損傷部位で停止した場合、損傷を含む鋳型に対して塩基を重合できる特殊なDNAポリメラーゼ(TLSポリメラーゼ)に一時的に置き換わり、複製を継続する機構である。TLSに異常のある疾患として、日光過敏症と高発癌性を示す色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum; XP）バリアント群(XP-V)がある。その責任遺伝子産物であるDNAポリメラーゼ・イータ(Pol η)は、主な紫外線損傷の一つであるシクロブタン型ピリミジン二量体を効率よく正確に乗り越えて複製することができる。Pol ηのパラログであるPol ιは、紫外線損傷に対してヌクレオチドを取り込む活性を持っているが、生理的役割がよく分かっていなかった。申請者が所属する研究グループは、紫外線照射によりPol η欠損マウスが皮膚の上皮性組織に、Pol ι欠損マウスが皮膚の間葉系組織に腫瘍を形成することから、Pol ηとPol ιはそれぞれの組織において紫外線による腫瘍の発生を抑制することを明らかにしてきた。

本申請者は、Pol ηとPol ιの欠損マウスで腫瘍の発生部位が異なることに着目し、マウスの組織・細胞レベルでのPol ηとPol ιの機能と制御を明らかにすることを目的に研究を行い、以下の結果を得た。

(1) 紫外線照射により生じた皮膚腫瘍における*p53*遺伝子上の突然変異を解析したところ、上皮性組織ではPol ηが、また間葉系組織ではPol ιが紫外線による突然変異の抑制を担っており、上皮性組織におけるPol ιおよび間葉系組織におけるPol ηは突然変異の誘発と抑制の両方に関与していた。また、上皮性組織と間葉系組織においてPol ηとPol ιの両方を欠損すると、特定の突然変異が増加することから、この変異の誘発には同一のポリメラーゼあるいはメカニズムが働いている可能性が示唆された。

(2) (1)に述べたTLSポリメラーゼの使い分けがどのように制御されているのかを調べるために、マウスの皮膚由来の表皮細胞と真皮細胞を樹立した。紫外線感受性を解析したところ、野生型真皮細胞は野生型表皮細胞よりも高い感受性を示すものの、Pol η欠損表皮細胞とPol η欠損真皮細胞は同程度の高い感受性を示した。一方、siRNAを用いたPol ιの発現抑制は、紫外線感受性には影響がなかった。さらに、紫外線損傷を持たせたプラスミドを細胞に導入し、その複製産物の突然変異を解析したところ、Pol η欠損による突然変異頻度の上昇が真皮細胞に比し表皮細胞で有意に高かった。またPol η欠損真皮細胞にPol ηを相補すると紫外線感受性が野生型真皮細胞と同程度にまで回復し、突然変異頻度も抑えられた。このことから、紫外線感受性の抑制にはPol ηによる効率の良いTLS反応が表皮細胞と真皮細胞の両細胞において必要であることが分かった。そして、突然変異頻度の抑制にはPol ηによる正確なTLS反応が必要であり、表皮細胞の方が真皮細胞よりもPol ηに対する依存度は高いことが判明した。

(3) 紫外線の除去効率を調べたところ、真皮細胞は表皮細胞よりも紫外線損傷の修復能力は低いことが分かった。また表皮細胞と真皮細胞との間でPol ηが関与するTLS反応に何らかの差異が生じている可能性を考え、紫外線照射後のPol ηの挙動を調べた。紫外線照射後にPol ηのタンパク質量が紫外線量依存的かつ継時的に減少しており、その程度は表皮細胞よりも真皮細胞においてより顕著に見られた。このPol ηのタンパク質量の減少は、プロテアソーム阻害剤であるMG-132の添加により抑えられたことから、プロテアソームを介したタンパク質分解によるものであることが分かった。表皮細胞よりも真皮細胞の方がMG-132の効果が顕著であることから、紫外線照射によるPol ηの分解は表皮細胞よりも真皮細胞においてより顕著であることが分かった。一方、Pol ιのタンパク質量は表皮および真皮の両細胞で、

紫外線照射による変動は見られなかった。

(4) マウス皮膚細胞内のPol ηとPol ιの分子数を定量したところ、表皮細胞と真皮細胞でPol ηとPol ιの分子数に差は見られず、Pol ηとPol ιは一細胞当たりそれぞれ$6x10^5$と$2.5x10^5$分子存在することが分かった。紫外線照射後のPol ηとPol ιの量的変動を定量し分子数に換算した結果、紫外線照射後に表皮細胞ではPol ηの分子数が若干減少するものの、Pol ιよりも多くの分子が細胞内に存在することが分かった。一方、真皮細胞ではPol ηが大きく減少した結果、照射後9時間以降でPol ηの分子数がPol ιよりも下回ることが分かった。このことから、Pol ηの顕著な分解により細胞内のPol ηとPol ιの量的バランスの変化をもたらす可能性が示唆された。

(5) 真皮細胞においてPol ηとPol ιの量的バランスの変化により、Pol ιがPol ηに代わって紫外線損傷に対するTLSに寄与している可能性を調べるため、真皮細胞にPol ιを過剰発現させた。Pol ιの過剰発現は真皮細胞において紫外線感受性に影響を与えなかったが、Pol η欠損細胞において紫外線損傷による突然変異頻度を抑制したことから、Pol ιは真皮細胞では突然変異の抑制に機能していることが明らかとなった。

以上のことから、表皮ではPol ηは紫外線照射に対する細胞の生存と突然変異の抑制に必要であり、Pol ηを欠損すると突然変異が蓄積し、腫瘍の形成が促進すると考えられる。一方、真皮においてもPol ηは紫外線照射に対する細胞の生存には必要だが、突然変異の抑制に対してPol ηは表皮ほど重要ではないと考えられる。真皮細胞では紫外線照射によりPol ηが顕著に分解することと、Pol ιを過剰発現させることで突然変異頻度が抑制されたこととを併せて考えると、真皮では紫外線照射後にPol ηを積極的に分解しPol ιによるTLSを誘発することで突然変異を抑制し、腫瘍の形成を防いでいると考えられる。したがって、表皮とは異なり真皮では紫外線照射後のPol ηの量的変化によりPol ιをはじめとした他のポリメラーゼをTLSに動員し、突然変異を抑制する機構の存在を新たに見出した。

以上を総合し、本研究は博士（理学）の学位を授与するに相応しいものと認める。