The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト REV1 の解析 : DNA ポリメラーゼ・イータとの相互作用がもつ生理的意義および分裂期の挙動について
Author(s)	赤木, 純一
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47239
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

【11】

氏　　名	赤　木　純　一（あか ぎ じゅん いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　２１０９８　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**ヒト REV1 の解析：DNA ポリメラーゼ・イータとの相互作用がもつ生理的意義および分裂期の挙動について**
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　前田　正知　　教　授　宇野　公之　　教　授　山口　明人

論　文　内　容　の　要　旨

遺伝情報を担う DNA は紫外線や化学物質などの外的要因、酸化ストレスや塩基の脱落などの内的な要因により、常に損傷を受け続けている。こうした DNA 損傷から遺伝情報を守るため、生物は多様な防御機構を発達させてきた。その一つである損傷乗り越え複製（translesion DNA synthesis；TLS）は複製装置が DNA 損傷に遭遇したとき、特殊な DNA ポリメラーゼによりこれを乗り越えて DNA 合成を進める機構である。ヒトには polη、polι、polκ、REV1 および REV3-REV7 複合体である polζ といった複数の TLS ポリメラーゼが存在し、それぞれ異なった特異性と正確さを持っている。これまでに我々を含む複数のグループの研究により、REV1 が他の４つの TLS ポリメラーゼと相互作用することが示されているが、この相互作用がどのような意味を持っているのかは未だ明らかとなっていない。

私は polη と REV1 の相互作用が持つ生理的な役割を解明するために、ヒト REV1 に対する新たな抗体を作成し、これを用いて細胞内の REV1 タンパク質を解析した。細胞内の REV1 タンパク質を定量すると、ヒト正常繊維芽細胞 WI-38 VA13 と XP-V 群患者由来細胞 XP2SA SV3 では細胞内の REV1 タンパク質の量はほぼ同じで、どちらの細胞でも一細胞あたりおよそ数万分子の REV1 が存在しており、polη の有無による差は見られなかった。同様に polη についても定量を行なったところ、WI-38 VA13 細胞では polη も一細胞当たりおよそ数万分子存在しており、正常細胞では polη と REV1 はほぼ１：１の割合で存在することが明らかとなった。

これらのタンパク質の細胞内局在を観察すると、XP2SA SV3 細胞において、GFP-polη の foci 形成により Myc-REV1 の foci 形成の促進が見られ、両者の局在はほぼ完全に一致していた。しかし、polη との相互作用領域を欠失させた場合は foci 形成の促進はみられず、両者の局在は部分的な一致にとどまっていた。このことから、REV1 の細胞内局在に polη が何らかの影響を与える可能性が示唆されたため、紫外線損傷への応答について解析を行なった。紫外線損傷への局在を明確にするため、マイクロポアフィルターを用いて局所的に紫外線を照射すると、WI-38 VA13 細胞では１時間後におよそ 35％の細胞で紫外線損傷部位への REV1 の局在が観察されたのに対し、XP2SA SV3 細胞では REV1 の局在は７％程度にとどまっていた。そして、XP2SA SV3 細胞に一過性または安定に polη を発現させると、REV1 が polη とともに紫外線損傷部位に局在した。これらの結果から、polη は紫外線損傷部位への REV1 の局在を促進することが明らかとなった。さらに、予期しないことに、polη と REV1 は S 期以外の細胞でも損傷部位への局在がみられ、これらの TLS ポリメラーゼを複製に依存せずに損傷部位に集積させる機構が存在する可能性が

示唆された。

最近の解析で、REV1 との相互作用には２つのフェニルアラニン（FF）を含む配列が必要であることが明らかになってきた。polη の配列中には４つの FF があり、そのうち中央の２つ、483-4FF と 531-2FF はこれまでに報告された REV1 との相互作用領域の中に存在する。そこで我々はこの２つの FF をアラニン（AA）に変異させた polη を作成し、細胞内での REV1 との相互作用を調べた。Myc-REV1 と FLAG-polη（野生型または FF-AA 二重変異体）を HeLa 細胞に発現させ、紫外線照射１時間後にクロマチン画分を調製して FLAG 抗体により免疫沈降を行ったところ、野生型 polη と比べて、FF-AA 二重変異体では Myc-REV1 との相互作用が著しく弱くなっていた。また *in vitro* で DNA 合成活性を調べると、FF-AA 二重変異体は野生型と同様にシクロブタン型ピリミジン二量体を乗り越える活性を保持していた。そこで野生型、483-4FF-AA 変異体、531-2FF-AA 変異体、483-4、531-2 FF-AA 二重変異体 polη を XPV 患者由来の XP2SA SV3 細胞に安定に発現させ、1 mM カフェイン存在下で紫外線感受性を測定したところ、これらの変異体はいずれも野生型と同様に XPV 細胞の紫外線感受性を相補した。また、6-チオグアニン耐性コロニーの出現率を指標として突然変異率を測定すると、FF-AA 二重変異体 polη は野生型 polη と同程度に紫外線誘発突然変異を抑制した。このことから、紫外線損傷の適切な TLS には polη 自身の活性が主要な役割を果たしており、REV1 との相互作用を失っていても polη 単独で TLS を完了できることが示唆された。一方、野生型 polη は XP2SA SV3 細胞の自然突然変異率を抑制したのに対して、FF-AA 二重変異体 polη は自然突然変異率についてはほとんど抑制できなかった。このことから、恒常的に生じる損傷を正しく乗り越えるために、polη と REV1 の相互作用が何らかの役割を果たしていることが予想される。

また、REV1 は分裂期細胞で特異的な挙動が見られた。ヒトの細胞では REV1 の量は細胞周期を通じてほぼ一定に保たれていたが、REV1 は分裂期の細胞で特異的にリン酸化を受けており、G1 期になると脱リン酸化されていた。このリン酸化反応は *in vitro* においても分裂期細胞の抽出液に特異的な活性がみられるため、分裂期特異的に活性を持つキナーゼにより触媒されると考えられる。また、REV1 は分裂期には染色体から離れ、中心体近傍領域に局在していた。一方 polη はそのような局在はみられず、REV1 は他の TLS ポリメラーゼにはない役割を分裂期に担っている可能性が示唆された。以上の結果から、REV1 はこれまでに考えられている TLS への関与だけでなく、細胞分裂においても何らかの役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

DNA 上に生じた損傷は、DNA 複製時において DNA 複製装置の進行を阻害することが知られている。細胞は、損傷による複製の阻害を組換え反応や、損傷を乗り越える複製反応（translesion synthesis ; TLS）により回避していると考えられている。当研究室で発見された DNA ポリメラーゼ・イータ（polη）は、ヒト高発がん性遺伝的疾患である色素性乾皮症バリアント群（XP-V）の責任遺伝子産物である。本論文では、polη と相互作用するタンパク質として、やはり TLS 反応に関与する REV1 に注目し、その polη との相互作用の生理的な意義および細胞分裂期における挙動について詳細に研究し、以下のような結果を得た。

1）まずヒト REV1 に対する新たな抗体を作成し、これを用いて細胞内の REV1 タンパク質が polη とほぼ同じ分子数（約 6×10^4 ）であること、polη を欠損する XP-V 細胞においては、野生型の細胞での挙動と異なって紫外線損傷部位への集積が見られないこと、XP-V 細胞に外から polη の遺伝子を導入し発現させると REV1 が紫外線損傷部位へ集積するようになることを観察した。このことから polη が REV1 の紫外線損傷部位への局在を促進することが明らかとなった。

2）polη の REV1 との相互作用に必須と思われる Phe が二つ連続した配列（FF）二箇所に変異を導入した polη FF-AA 二重変異体を XP-V 細胞に導入して解析した。この二重変異体は、野生型 polη と同様に XP-V 細胞の紫外線感受性を回復させ、また紫外線による突然変異の誘発率を抑制したが、自然突然変異率の抑制は十分でなかった。このことは、紫外線損傷の適切な TLS には polη の REV1 との相互作用は重要ではないが、恒常的に生じる損傷を正しく乗り越えるために polη と REV1 の相互作用が働いていることを示唆している。

3）細胞内における REV1 の挙動を調べる過程で、分裂期において REV1 が染色体から遊離し、中心体近傍に局在することを見い出した。polη にはそのような局在は見られず、REV1 は他の TLS ポリメラーゼにはない役割を分裂期に有している可能性がある。REV1 は分裂期にはリン酸化を受けており、G1 期になると脱リン酸化されることから、分裂期における REV1 の局在にはそのリン酸化が関与していると思われる。

以上のように、本論文はヒト REV1 の機能に関して新たな知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考える。