

Title	Characterization of XPC-hHR23B complex in nucleotide excision repair and investigation of another role of hHR23 proteins
Author(s)	横井, 雅幸
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3143781
DOI	10.11501/3143781
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	横井雅幸
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第13667号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生理学専攻
学位論文名	Characterization of XPC-hHR23B complex in nucleotide excision repair and investigation of another role of hHR23 proteins (ヌクレオチド除去修復因子 XPC と hHR23 の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 寿人 (副査) 教授 花岡 文雄 教授 品川日出男 教授 倉光成紀

論文内容の要旨

XPC-hHR23B 複合体の持つ損傷 DNA への親和性と、本複合体が TFIIH と相互作用する可能性が示唆されていることから、私は、本複合体がヌクレオチド除去修復(NER)機構によるゲノム全体の修復(GGR)において、損傷認識から NER 因子の導入に極めて中心的な役割を担うのではないかと想定した。この仮定に基づき、免疫沈降法により細胞抽出液中から XPC-hHR23B 複合体と TFIIH との相互作用を示唆する結果を得た。さらに精製蛋白質および組換え蛋白質を用いた実験から、本複合体と TFIIH は確かに直接相互作用すること、そしてこの相互作用は、TFIIH 構成因子である XPB 蛋白質および p62 蛋白質と XPC 蛋白質との結合によるものであることを示した。これらのデータにより、これまで明らかでなかった両複合体間の相互作用を証明した。また、DNA セルロースによる各種 XP 群細胞抽出液に対する共沈降実験の結果、NER が正常な細胞の抽出液からは、DNA 結合フラクションに TFIIH が検出されるのに対し、XP-C 群細胞抽出液からのみ TFIIH の回収ができなかった。しかし、XPC-hHR23B 複合体を予め加えることで、XP-C 群細胞抽出液から TFIIH が回収されることから、本複合体は、TFIIH の DNA への導入、あるいは DNA 上での TFIIH の保持に必要であることが強く示唆される。この傾向は、損傷 DNA を用いた実験で特に顕著であることから、実際の GGR における XPC-hHR23B 複合体の役割は損傷部位への TFIIH の導入過程にあると予想される。

また特に hHR23B 蛋白質については、その一次構造上の特徴からユビキチン系蛋白質分解への関与が示唆されていた。そこで酵母 two-hybrid 法によるスクリーニングを行った結果、26S プロテアソーム構成因子の一つ S5a 蛋白質と結合することを明らかにした。本論文では、クローニングした S5a を大腸菌の蛋白質発現系で多量発現し、組換え S5a が hHR23B およびもう一つの出芽酵母 RAD23 ヒトホモログである hHR23A と結合することを *in vitro* の実験から明らかにした。数種類の S5a 変異体蛋白質を発現させ、hHR23A あるいは hHR23B との相互作用を解析した結果、S5a のポリユビキチン鎖結合領域とは異なる領域で直接相互作用していること、さらに hHR23B の変異体を用いた実験から、同蛋白質のユビキチン様領域が S5a との結合に必要な十分であることが分かった。また、HeLa 細胞抽出液(S100)のグリセロール密度勾配遠心分画サンプルをウェスタンブロットで解析した結果、両 hHR23 蛋白質が 26S プロテアソームの分布と一致したことから、hHR23 蛋白質がユビキチン系蛋白質分解に直接関与している可能性が初めて示唆された。

論文審査の結果の要旨

hHR23 A/Bは酵母 Rad23 のヒトホモログで細胞内に豊富な蛋白質である。本研究は、hHR23 A/B 蛋白質の機能について解析したものである。

申請者は、まず DNA 損傷のヌクレオチド除去修復に関与する XPC-hHR23B 複合体が TFIIH と直接に結合することを明らかにし、XPC-hHR23B の役割が、TFIIH を DNA 損傷部位に導くことにあるというモデルを示した。

申請者はまた、hHR23 蛋白質がユビキチン様の構造を持つことに注目し、hHR23 が 26S プロテアソームの構成因子 S5a に結合することを明らかにした。また hHR23 が S5a への結合を介して、ATP 依存的に 26S プロテアソームに組み込まれることを示唆する結果を得た。これらの結果は、hHR23 がユビキチン系蛋白質分解に直接関与する可能性を示した。

本研究は、ヌクレオチド除去修復と細胞内蛋白質メタボリズムの双方に関与する hHR23 蛋白質について新しい知見をもたらしたもので、博士（理学）の論文として価値あるものと認める。