The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	NMR Studies of the DNA-and RPA-Binding Domain of Human DNA Repair Protein XPA
Author(s)	池上, 貴久
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155667
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	池上貴久（いけがみ たかひさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　14779　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	NMR Studies of the DNA-and RPA-Binding Domain of Human DNA Repair Protein XPA （ヒト遺伝子修復蛋白質 XPA の DNA および RPA 結合ドメインの NMR による研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　京極　好正 （副査） 教　授　品川日出夫　　教　授　後藤　祐児　　教　授　田中亀代次

論文内容の要旨

遺伝子修復系は，放射線，紫外線，化学変異剤，複製エラーなどで損傷を受けたDNAを修復する，生体維持に必須な機構である。とりわけヌクレオチド除去修復（NER）は，多種多様なDNA損傷に対処でき，真核生物では約30種類の蛋白質が関与すると考えられている。当研究の対象であるXPA蛋白質は，真核生物の一連のNER機能の内，初期段階である塩基損傷部位の認識と修復系蛋白質の複合体形成の一部を担うと考えられている。XPAを含めいくつかのNER因子の変異は，常染色体劣性遺伝病である色素性乾皮症（Xeroderma Pigmentosum）の原因である。XP患者は，紫外線などで損傷を受けたDNAの修復機構に障害を持つため，高頻度の皮膚癌，臓器癌，神経変性，知能障害などの症状をおこす。

全長273残基からなるヒトXPA蛋白質が認識するDNA損傷の種類は，紫外線による損傷からcisplatinなどの化学物質による損傷までの広い範囲にわたる。Zinc-finger領域を含む中央ドメイン（Met98-Phe219, 122残基）は，損傷DNAに選択的に結合し，また遺伝子複製にも関与する蛋白質RPA（replication protein A）との結合能を有する最小ドメインであることが分かっている。筆者は，XPA蛋白質が多種類のDNA損傷を認識する機構と他の蛋白質と相互作用する機構を立体構造の観点から研究するため，核磁気共鳴法（NMR）を用いて，XPA中央ドメインの立体構造の決定，運動性の解析，およびDNA，RPA70と相互作用する部位の決定を行った。

まず，^{15}N, ^{13}C, (80% ^{2}H) で安定同位体ラベルした中央ドメインを精製し，一連の多核共鳴多次元NMR測定により，各原子の化学シフトの帰属，^{1}H間距離情報であるNOEスペクトルの解析，二面角度情報であるスカラー結合定数の測定，水素結合情報であるアミド水素／重水素交換速度の測定を行った。1,389個の距離制限（水素結合制限47個を含む）および，83個の角度制限をもとに，simulated annealing法により立体構造を計算した。その結果，中央ドメインは，亜鉛含有サブドメインとC末側サブドメインからなることが分かった。前者は，DNA結合転写因子であるGATA-1やGREのzinc-fingerと同様の亜鉛配位や局所水素結合網をもつが，亜鉛含有サブドメイン全体は新規で安定な構造をとっていた。後者も，新規な折りたたみを持ち，特徴として正に荷電した大きなくぼみをもっていた。両サブドメインの間には疎水性残基による相互作用が存在した。次に，RPAの単鎖DNA結合ドメイン（RPA70サブユニットの181-422残基からなるドメイン），あるいは，cisplatinによる損傷24-mer二本鎖DNAが中央ドメインに結合する部位をXPAの化学シフトの変化により同定した。その結果，亜鉛含有サブドメインはRPA $70_{181-422}$ と相互作用し，C末側サブドメインのくぼみはDNAと相互作用することが分かった。最後に，アミド^{15}N核

の緩和時間の測定と解析から，中央ドメインの運動性を解析した。その結果，分子全体の溶液内での回転拡散には異方性が存在し（回転拡散テンソルの主値の比率が1.38），その異方性も考慮した内部運動の解析からC末側サブドメインのくぼみ領域が非常に柔軟であることが分かった。そのくぼみの柔軟性は，XPA蛋白質が構造の異なるさまざまなDNA損傷に適応して結合し，それらを認識するために必要であると考察される。

論文審査の結果の要旨

池上貴久君は，ヒト遺伝子修復の初期段階で関与するXPA蛋白質のコアドメイン（122残基）の溶液内立体構造をNMR法で決定し，その部分に，DNA結合サブドメインと，RPA蛋白質との結合サブドメインの存在することを明らかにした。本研究は，損傷DNA修復機構の初期段階を，構造的見地から明らかにした点で，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。