

Title	The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage
Author(s)	朝比奈, 宏
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39329
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	朝 比 奈 宏 <small>あさ ひ な ひろし</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 5 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 2 月 2 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	The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA damage (色素性乾皮症 A 群遺伝子産物の DNA 損傷認識能と亜鉛結合性について)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 田中亀代次 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) は常染色体性劣性遺伝形式によって発病する高発癌性遺伝疾患であり, XP 患者から採取した細胞が紫外線 (UV) に対して高感受性を示すことから DNA 損傷の修復過程に異常のある事がわかっている。また A 群から G 群の 7 つの相補性群とバリエーションの 8 型が見出されており, その分子レベルでの病態解明はヒトにおける DNA 修復機構を知る上で重要な意義をもっている。A 群 XP 遺伝子は 1989 年に田中らによってクローニングされ, cDNA から予想されるアミノ酸配列から核移行シグナルや Zn-フィンガー・モチーフなどの特徴的な機能ドメインを持つ事が明らかになった。本研究では, A 群 XP 遺伝子産物 (XPA 蛋白) を遺伝子工学的に大腸菌から大量に調製し, その機能と構造を生化学的・物理化学的に解析する事を目的とした。

[方法ならびに結果]

組替え XPA 蛋白の調製-XPA 遺伝子の野生型と Zn-フィンガーを構成している 108 番目のアミノ酸をシステインからセリンになるよう改変した変異型の cDNA をそれぞれ蛋白発現用プラスミド (pET-3c) に組み込んだ後, 大腸菌 (BL21 (DE3) pLysS) に導入し蛋白を合成させた。これらの蛋白は不溶性の封入体 (inclusion body) として回収されるので, 一度塩酸ゲアニジンによって可溶化し再び透析によって活性化させた。それらをハイドロキシアパタイトカラムで精製し SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって約 40kDa の XPA 蛋白を得た。

XPA 蛋白の DNA 修復活性測定-マイクロインジェクションにより細胞 (正常および XP) に XPA 蛋白を注入し, 紫外線 (ultraviolet ; UV) 照射後 [6-³H]-thymidine を含む培養液でラベルして固定し, 乳剤でコート・感光させ, 不定期 DNA 合成 (unscheduled DNA syntehsis ; UDS, 細胞周期とは無関係におこる DNA 修復合成) をオートラジオグラフィにより細胞核上の黒い粒子として観察した。その結果, 野生型 XPA 蛋白は A 群 XP 細胞にのみ有効で他の相補性群細胞には効果がなかった。正常細胞にも特に変化はみられなかった。また UV の代わりに 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) で細胞を処理した場合にも UDS の回復がみられた。しかし変異型 XPA 蛋白では全ての細胞で何の変化も起こらなかった。

XPA 蛋白の DNA 結合活性の測定 - EcoRI で切断した M13DNA を [α - 32 P] dATP でラベルし UV を照射したもの、あるいは未照射のものを XPA 蛋白と混ぜて蛋白-DNA 複合体の量をフィルターバインディングアッセイにより測定した。その結果、野生型 XPA 蛋白は UV 照射しない DNA にも結合するが、UV 照射した DNA により多く結合することがわかった。同様の結果は DNA をシスプラチン (cisdiamminedichloroplatinum (II) ; CDDP) やオスmium酸 (osmium tetroxide ; OsO₄) で処理して DNA 損傷を作らせた場合にも観察された。変異型 XPA 蛋白では DNA への結合はほとんど見られなかった。

XPA 蛋白の亜鉛含有量の測定を円偏光二色性 (circular dichroism ; CD) による構造解析 - 亜鉛含有量の測定は原子吸光分析法により行った。その結果 XPA 蛋白1分子当たり約3個の亜鉛分子が結合していることが観察された。また CD による構造解析では、野生型 XPA 蛋白は二次構造の存在が示唆されたが、変異型はランダム構造であると考えられた。また野生型及び変異型 XPA 蛋白に、典型的な α -ヘリックス・ β -シート・ランダムコイルのスペクトルを基準とした二次構造解析プログラムを適用してみたが、共にフィッティングせず、含有率の解析はできなかった。

[総括]

大腸菌で産生された組換え XPA 蛋白は、実際にヒト細胞内に存在する XPA 蛋白と同様に A群 XP 細胞の DNA 修復能を回復させる事ができる。その注入した量から算定すると細胞当たり $2 \times 10^3 \sim 10^4$ 分子の XPA 蛋白が存在するものと思われる。DNA 結合活性において UV や CDDP, Os O₄ によって処理された DNA に対して未処理の DNA よりも優先的に結合することから、XPA 蛋白は多様な DNA 損傷を認識し、DNA 修復過程の初期段階に働くものと考えられる。

原子吸光分析法により XPA 蛋白1分子当たり約3個の亜鉛原子が結合していると推測されるが、アミノ酸配列上予想される Zn-フィンガー・モチーフは一つしか見当たらないので通常とは違った結合様式をとっている可能性がある。また CD の結果から野生型 XPA 蛋白では何らかの立体構造が存在するのにに対して Zn-フィンガー・モチーフを改変した変異型では立体構造が保たれていないことから、その部分が構造的に意味があることは間違いないと思われるが、機能との直接的な関係は明らかではない。

本研究では XPA 蛋白の機能及び構造解析において大腸菌による組換え体の有用性を示したが、DNA 修復機能での役割や病態との因果関係については今後も詳細な研究が必要である。

論文審査の結果の要旨

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) は常染色体性劣性遺伝形式によって発病する高発癌性遺伝疾患であり、その分子レベルでの病態解明はヒトにおける DNA 修復機構を知る上で重要である。本研究では、A群 XP 遺伝子産物 (XPA 蛋白) を遺伝子工学的に大腸菌から大量に調製してその機能と構造を生化学的・物理化学的に解析した。その結果、(1) 大腸菌で産生された組換え XPA 蛋白が、実際にヒト細胞内に存在する XPA 蛋白と同様に、A群 XP 細胞の DNA 修復機能を回復させること、(2) DNA 結合活性において多様な DNA 損傷を認識すること、(3) 原子吸光分析法により XPA 蛋白1分子当たり約3個の亜鉛原子が結合していること、(4) 円偏光二色性 (circular dichroism ; CD) による構造解析により、野生型 XPA 蛋白では何らかの立体構造が存在するのにに対して、Zn-フィンガー・モチーフを改変した変異型蛋白では立体構造が保たれていないことから、その部分が構造的に重要であることなどがわかった。これらの結果が A群 XP の解析を始めヒト DNA 修復機構の研究に与える意義は大きく、本論文は学位授与に値すると認められる。