The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of a damaged−DNA binding domain of the XPA protein
Author(s)	倉岡, 功
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39849
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

【17】

氏　　名	倉岡　功（くらおか　いさお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12366　号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Identification of a damaged－DNA binding domain of the XPA protein （XPA蛋白質のDNA結合ドメインの特定）
論文審査委員	（主査） 教　授　田中亀代次 （副査） 教　授　米田　悦啓　　教　授　花岡　文雄

論文内容の要旨

（目的）

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：XP）は，日光過敏症，皮膚癌高頻度発生，精神神経症状合併を臨床的特徴とするヒト遺伝疾患である。XP患者が日光過敏症を示すことに対応して，患者由来の細胞は紫外線（ultra-violet light：UV）に対して高感受性を示す。これはXP細胞がヌクレオチド除去修復機構（nucleotide excision repair：NER）に異常を持つためである。XPA遺伝子は色素性乾皮症A群の原因遺伝子で，Znフィンガーモチーフを含んだ273個のアミノ酸からなる蛋白質をコードする。XPA蛋白質は紫外線照射および化学変異原物質によって処理されたDNAに選択的に結合するということから，NERの初期段階において，損傷DNAの認識過程に関与する蛋白質であることが示唆されている。

本研究は，XPA蛋白質の損傷DNA結合活性に必須な機能ドメインを特定することを目的とした。

（方法ならびに成績）

1，XPA蛋白質の限定分解およびその精製

XPA蛋白質をキモトリプシン処理により限定分解し，SDS－PAGEによって，29，27および20kDaの3つのポリペプチドを検出した。これらのポリペプチドをゲルから回収し，それらのDNA結合能をサウスウエスタン法を用いて解析した。その結果，27kDaのポリペプチドがDNA結合活性を保持している最小の断片であることがわかった。このポリペプチドのN末端アミノ酸配列を決定したところ，XPA蛋白質の49番目のセリンから始まっていることがわかった。一方，C末端のアミノ酸配列は，そのポリペプチドのSDS－PAGEにより推定される分子量とキモトリプシンの切断部位特異性から，194番目のトリプトファン，219番目のフェニルアラニンおよび235番目のトリプトファンの3つが候補として考えられた。

2，短縮XPA蛋白質の作成および損傷DNA結合能

27kDaのポリペプチドに対応する短縮XPA蛋白質を作成するために，上記のN末端およびC末端をもつ蛋白質をコードするcDNAの作成をPCRによって行ない，それを大腸菌での蛋白質発現ベクターpET－16bにつなぎ，短縮蛋白質（SW188，SF172およびSW147）を発現，精製した。作成した蛋白質のSDS－PAGEによる解析から，キモトリプシン限定分解により生成した27kDaのポリペプチドはSF172と一致することがわかった。さらに，DNA結合ドメインを狭めるためにより短い短縮XPA蛋白質（MF122およびMF107）も同時に精製した。フィル

ターバインディングアッセイにより，これらの短縮ＸＰＡ蛋白質が紫外線およびシスプラチン処理による損傷ＤＮＡに対して結合活性を保持しているかどうかを調べた。その結果，27kDaのポリペプチドに対応するＳＦ172のみならずＭＦ122が野性型ＸＰＡ蛋白質と同じように損傷ＤＮＡに選択的に結合する活性を有していた。以上の結果より，ＸＰＡ蛋白質の損傷ＤＮＡ結合ドメインはＭＦ122の領域に存在することがわかった。

３，ＭＦ122の性質

ＭＦ122はZnフィンガーモチーフを含む122個のアミノ酸からなる親水性蛋白質である。ＭＦ122が二次構造を保っているかどうかをＵＶ－ＣＤスペクトルによって調べた結果，αヘリックス47.8%，βシート13.6%およびランダムコイル22.0%を含む，安定な二次構造を保ち，αヘリックス構造に富んだ蛋白質であることがわかった。また，原子吸光法により，１つのＭＦ122分子に１つのZnイオンが含まれていることがわかった。さらに，Znフィンガーモチーフに含まれるZn（Ⅱ）イオンを^{113}Cd（Ⅱ）イオンに置き換えた後，ＮＭＲ解析を行った結果，ＭＦ122は新しいＣ４タイプのZnフィンガーモチーフを１つ持つ蛋白質であることが証明された。

（総括）

キモトリプシンによる限定分解およびサウスウエスタン法の結果にもとづいて種々の短縮ＸＰＡ蛋白質を作成した。これらの蛋白質のＤＮＡ結合能をフィルターバインディングアッセイによって解析した。その結果，ＸＰＡ蛋白質の損傷ＤＮＡ結合活性に必須な機能ドメインがＭＦ122領域に存在することを特定した。ＭＦ122領域を解析した結果，ＸＰＡ蛋白質は新しいＣ４タイプのZnフィンガーモチーフをもつことが証明された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ヌクレオチド除去修復の損傷ＤＮＡ認識過程に関与するＸＰＡ蛋白質のＤＮＡ結合ドメインを特定し，解析したものである。本研究で特定されたＤＮＡ結合ドメインＭＦ122蛋白質は，122のアミノ酸残基からなり，野性型ＸＰＡ蛋白質と同等の損傷ＤＮＡに特異的に結合する活性を有していた。ＭＦ122蛋白質はそのアミノ酸配列上にＤＮＡ結合タンパク質によく見られるZnフィンガー領域を含んでおり，４つのシステインにより１つのZnイオンを配位していることが明らかになった。このZnフィンガー領域の二次構造予測からＸＰＡ蛋白質はこれまで知られたものと異なったタイプのZnフィンガー構造をもつことが示唆された。

さらに，これらの成果はＸＰＡ蛋白質の損傷ＤＮＡ結合ドメインの高次構造を解析し，損傷ＤＮＡとＸＰＡ蛋白質の結合様式をＮＭＲおよびＸ線結晶解析を用いて解析する上でも必須のものと考えられる。

以上の論文内容はヌクレオチド除去修復の損傷ＤＮＡ認識過程におけるＸＰＡ蛋白質の構造および機能の解析に貢献するものであり，学位授与に値するものと認められる。