



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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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

氏 名	倉 岡 功
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 6 6 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。