The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA)
Author(s)	松田, 外志朗
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3109936
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【18】

氏　　名	松　田　外志朗（まつだ　としろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12367　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	DNA repair protein XPA binds replication protein A（RPA） （XPA蛋白質は replication protein Aと結合する）
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，精神神経症状を臨床的特徴とする常染色体劣遺伝性疾患であり，7つの遺伝的相補性群が存在し，ヌクレオチド除去修復機構（NER）に異常を持つことが知られている。NERには，多くの蛋白質が関与していると考えられている。XPA遺伝子はA群XPの原因遺伝子で，XPA蛋白質は，損傷DNAに選択的に結合することから，NERにおいて，最初のステップである損傷認識に関わると考えられる。このXPA蛋白質を手掛かりとし，NERに関与する蛋白質間の相互作用，複合体の形成を明らかにすることにより，NERの初期過程を明らかにすることが本研究の目的である。

（方法ならびに成績）

1．XPA結合蛋白質のスクリーニング

Yeast two－hybrid system を用いてXPA蛋白質と結合する蛋白質を検索した。GAL4 DNA結合ドメインベクターとして pGBT9，GAL4転写活性化ドメインベクターとして pGAD424，pGAD GHを用いた。酵母 HF7c に pGBT9－XPAを導入し，続いて pGAD GH HeLa cDNA library を導入した。ロイシン，トリプトファン，ヒスチジン欠乏培地にて生育したコロニーをフィルターアッセイにてβ－ガラクトシダーゼ活性を指標とし，120万個のクローンをスクリーニングすることにより39個のポジティブクローンを得た。ポジティブクローンからプラスミドDNAを回収後，HF7cに再導入し，XPA蛋白質との特異的な結合を確認した。単離したプラスミドDNAのインサート cDNA をプローブとしたドットブロットハイブリダイゼーション法により，これらのポジティブクローンは3種類に分類された。それぞれDNA塩基配列を解析し，予想されるアミノ酸配列を用いて，データベースによるホモロジーサーチを施行した。3種類のうち2種類は，未同定の蛋白質であったが，残りの1種は replication protein A（RPA）の34kDa のサブユニット（p34）であることが判明した。RPAは，複製，組換え機構に必須な蛋白質であることが知られており，NERにも必須であると報告されていたがその役割は不明であった。

Yeast two－hybrid system では，p34は，既知の修復蛋白質であるERCC1，XPB，XPC，XPD蛋白質とは結合せず，XPA蛋白質と特異的な結合を示した。また，XPA蛋白質は p34の他にERCC1蛋白質にも特異的な結合を示した。

2．XPA蛋白質とRPAとの結合

グルタチオンＳトランスフェラーゼとの融合蛋白質ＧＳＴ－p34は，*in vitro* translation法にて生成させたＸＰＡ蛋白質と特異的に結合した。また，同様にＧＳＴ－ＸＰＡとp34も結合することを確認した。ＲＰＡは，70，34，11kDaの３つのサブユニットの複合体である。ＸＰＡ蛋白質はHeLa細胞から精製したＲＰＡ複合体とも結合した。さらに，全細胞抽出液を抗ＸＰＡ蛋白質ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降させ，ＲＰＡの各サブユニットのモノクローナル抗体でウエスタンブロッティングすることにより，ＲＰＡとＸＰＡ蛋白質が共沈することを示した。

３．ＸＰＡ蛋白質とＲＰＡとの結合の意義

ＸＰＡ蛋白質は，損傷ＤＮＡに選択的に結合するが，ＲＰＡとＸＰＡ蛋白質との結合が損傷認識に影響を与えるかフィルターバインディング法にて検討した。ＲＰＡ存在下では，ＸＰＡ蛋白質のＵＶ損傷ＤＮＡに対する結合能の増強を認め，ＲＰＡとＸＰＡ蛋白質との結合が損傷認識に関わることを示唆した。

（総括）

１．Yeast two－hybrid systemを用いてＸＰＡ蛋白質と結合する蛋白質を検索した。３種類のＸＰＡ蛋白質が得られた。２種類は，未知の蛋白質であることが判明したが，残りの１種は，複製機構に必須な蛋白質として知られるreplication protein Ａ（ＲＰＡ）の34kDaのサブユニット（p34）であった。

２．*in vitro*でＸＰＡ蛋白質は，p34のみならず精製ＲＰＡとも結合した。さらに抗ＸＰＡ抗体によりＲＰＡは共沈し，*in vivo*におけるＸＰＡ蛋白質とＲＰＡとの結合を示唆した。

３．ＲＰＡは，複製，組換え機構のみならず，ＮＥＲにも必須な蛋白質であることが示されていたが，ＸＰＡ蛋白質と結合し，その損傷認識能を高めることから，ＲＰＡがＮＥＲにおいて損傷認識のステップに関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ヌクレオチド除去修復機構（ＮＥＲ）の初期過程の詳細を明らかにすることを目的としたものである。ＸＰＡ蛋白質は，ＮＥＲの最初のステップである損傷認識に関わる事が知られている。このＸＰＡ蛋白質に結合する蛋白質を検索し，ＮＥＲの初期過程における蛋白質間の相互作用について検討している。

ＸＰＡ蛋白質と結合する蛋白質として同定されたreplication protein Ａ（ＲＰＡ）は，複製，組換え機構およびＮＥＲに必須な蛋白質であると報告されていたが，そのＮＥＲにおける役割は不明であった。本研究によりＲＰＡがＸＰＡ蛋白質と結合し，ＸＰＡ蛋白質の損傷認識能を高めることが明らかにされた。これは，ＲＰＡがＮＥＲにおいて損傷認識のステップに関与することを示唆するものできわめて重要な知見である。さらに従来ＸＰＡ蛋白質は損傷ＤＮＡに選択的に結合することが示されていたが，結合能が比較的弱いことも指摘されており，蛋白質間の相互作用により損傷認識能が高まることは，これに一つの解答を示すこととなった。また，ＲＰＡの34kDaのサブユニット（p34）は，他の蛋白質との相互作用を予想されていたものである。ＸＰＡ蛋白質は，p34と結合する生体内の蛋白質として初めて報告されたもので，この点においても大きな意義を持ち，未だ明らかでない生体内におけるＤＮＡ複製や組換えにおけるＲＰＡの蛋白質間の相互作用の解明にも示唆を与える知見と考えられる。

以上から，本研究は学位に値すると考えられる。