

Title	試験管内におけるヒトのヌクレオチド除去修復反応の再構成及びXPC複合体のサブユニット構造の解析
Author(s)	荒木, 真理人
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41970
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	あら き ま り と 荒 木 真 理 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 5 3 6 3 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	試験管内におけるヒトのヌクレオチド除去修復反応の再構成及びXPC 複合体のサブユニット構造の解析
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 前田 正知 教授 西原 力 教授 山口 明人

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝情報の担い手であるDNAは、周囲の環境や自らの代謝産物由来の化学物質により常に傷つけられている。損傷したDNAは、DNAの複製や転写といったDNA代謝反応を阻害し細胞死を引き起こすだけでなく、遺伝子変異の原因となり、個体の突然変異を招くことがある。現在ではこのような染色体DNA上の変異の蓄積が、哺乳類の癌や老化を引き起こすと考えられている。しかし生物は、大腸菌からヒトまでDNA損傷を効率よく修復する機能を備えており、DNA損傷による遺伝子変異を未然に防いでいる。また、DNA損傷修復機構はDNA損傷の種類に応じて複数存在し、それぞれが特異的な損傷を修復している。このようなDNA修復機構の中でも、最も広範なDNA損傷を修復することができるのがヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair; NER) である。

ヒトでは古くから、NERを欠損する常染色体性劣性の遺伝病として、色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum; XP) などがこれまでに知られている。XP患者は、紫外線によりDNA上に生じる損傷が修復できないことから、日光過敏症を呈し、高頻度で皮膚癌を発症する。現在、XP患者は欠損する遺伝子の違いによって、8つの相補性群に分類されており、患者から樹立された細胞株を用いて、ヒトのNER機構の研究が行われてきた。そして、XP各群の責任遺伝子の同定や、遺伝子産物の生化学的な解析が進められている。しかし、これまでの解析は主に裸のDNAを用いた解析であり、ヒトの細胞内で染色体DNAがクロマチン構造を形成している点は殆ど考慮されておらず、クロマチンDNA上におけるNERの反応機構については解析されていなかった。

そこで私は、無細胞系におけるクロマチンDNA上でのヒトのNER反応機構の解析に必須な、クロマチンDNAを基質とする無細胞再構成NER系の構築を目的として本論文の前半の実験を行った。基質には、SV40ウイルスのミニ染色体に、紫外線照射によりDNA損傷を導入したものをを用いた。再構成を目指す戦略は、1) NERの正常な培養細胞より調製した全細胞抽出液のカラムによる分画、2) 分画したサンプルによる試験管内でのNER反応の再構成、3) 分画したサンプルに含まれる既知のNER因子のイムノプロット法による検出および定量、4) 既知NER因子を含む画分を高度に精製した既知因子で順次置き換えていく、という四段階で行った。もし、4の段階でカラム画分の置き換えが不十分であれば、その画分についてさらに1から4のサイクルを繰り返すことで、損傷DNAを切除する段階でNER因子と協調的にクロマチン構造に働きかける因子が単離できると考えた。

実験の結果、次の事が明らかになった。すなわち、1) ミニ染色体上におけるNER反応は、裸のDNAを基質に用いたときと同じ因子群で再構成されること、2) NERを促進する未知の因子が存在し得ること、3) 短い反応時

間ではミニ染色体上での修復効率が裸の DNA とほとんど同じであること、4) 損傷 DNA 切り出し反応を長時間行うと、クロマチン構造による抑制が見られることである。これらの実験結果と、クロマチン上に生じる DNA 損傷の種類や局在の違いに加え、損傷の種類に応じた修復効率の違いを合わせて考察することで、次のように推論した。すなわち、SV40ミニ染色体を基質とする再構成NER 系では、紫外線照射によりヌクレオソームのリンカー部分に高頻度で生じる 6-4 光産物が効率良く修復されるのに対し、ヌクレオソームのコアの部分での修復効率が低下しているのである。本論文中には示さなかったが、SV40ミニ染色体よりもはるかに均一な構造をもつ、モデル基質を用いてより詳細な解析を行ったところ、再構成系における損傷 DNA の切り出しは、ヌクレオソーム構造によりほぼ完全に抑制された。そしてこの抑制は、クロマチン構造のリモデリング活性を持つ蛋白質により、有意に解消されることが明らかになりつつある。

さらに私は、NER 反応の再構成を行うために、HeLa細胞の核抽出液からXPC 複合体を精製したところ、新たに三番目のサブユニット Cen 2 を見いだした。Cen 2 は、出芽酵母を用いた遺伝学的な解析などから、細胞分裂装置の中心体の構成成分であることや中心体の複製に必須な働きをしていることが知られていた。しかし、NER はもちろんDNA代謝との関連は全く知られていなかった。そこで、Cen 2 のNERにおける役割を明らかにするために、組換え蛋白質を作成し、先に構築した無細胞NER再構成系などを用いて生化学的な解析を行った。この際、もう一つのXPC構成サブユニットHR23Bと併せて機能解析を行い、次のことを明らかにした。すなわち、1) Cen 2 がXPCと直接相互作用すること、2) HR23BがNERの初期反応において損傷の認識に中心的な役割を果たすXPCの構造を安定化することでNERを促進すること、3) HR23BによるXPCの構造の安定化が、XPCの損傷DNAへの結合に必須であること、4) Cen 2、HR23Bいずれも、溶液中におけるXPCの損傷DNA結合活性維持に働き、その効果が相加的であることである。

特に、HR23BがXPCの構造を安定化して、NERを促進することが明らかになったことから、XPCがNER反応中に大きな構造変化をしていることが示唆されたことは非常に興味深いことである。また、NERの開始因子であり、損傷DNA結合活性を有するXPC複合体に、Cen 2という細胞周期制御に関わる因子が含まれていることは大きな驚きであるとともに、今後の解析により、これまで解析が進んでいなかった細胞周期とNERとの協調的な制御機構が解明される大きな礎となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

遺伝情報の担い手であるDNAは、様々な要因により常に損傷を受けている。損傷DNAは、遺伝子変異の原因となり、哺乳類の癌や老化を引き起こすと考えられている。しかし生物には、様々なDNA損傷を効率よく修復する機構が複数存在し、それぞれが特異的な損傷を修復している。このようなDNA修復機構の中でも、最も広範なDNA損傷を修復するのがヌクレオチド除去修復機構(NER)である。ヒトではNERを欠損すると、高発癌性の遺伝性疾患として知られる色素性乾皮症(XP)を発症する。これらのXP患者で欠損するNER機構を解明することは、ヒトの発癌メカニズムの解明やXPの発症を予防する方法を確立する上で極めて重要である。

著者は、染色体DNA上におけるヒトのNER反応機構を明らかにする目的で、SV40ウイルスのミニ染色体に紫外線照射によりDNA損傷を導入したものを基質とする、無細胞NER系の精製蛋白質のみによる再構成を行い、次のことを明らかにした。

- 1) ミニ染色体上におけるNER反応は、裸のDNAを基質に用いたときと同じ6つの因子(XPA、XPC複合体、XPF複合体、XPG、RPA、TFIIH)で再構成されること。
- 2) NERを促進する未知の因子が存在し得ること。
- 3) 短い反応時間ではミニ染色体上での修復効率が裸のDNAとほぼ同じであること。
- 4) 損傷DNA切り出し反応を長時間行うと、クロマチン構造による抑制が見られたことなどから、ヌクレオソームのコアの部分におけるNERに、クロマチンリモデリング因子が関与し得ること。

さらに著者は、ヒトHeLa細胞から精製したNER因子XPC複合体中にXPCとHR23B以外に新たに3番目のサ

ブユニットを見だし、次のことを明らかにした。

- 1) XPC 複合体中に中心体構成因子 Cen 2 が含まれていること。
- 2) Cen 2 が XPC と直接相互作用すること。
- 3) 再構成 NER 系において HR23B が XPC に依存して NER を促進すること。
- 4) HR23B が、XPC の構造を安定化することで、NER を促進すること。
- 5) Cen 2 が HR23B による XPC の安定化に補助的な役割を果たすこと。
- 6) Cen 2 を介して XPC 複合体が、細胞周期やストレス応答系の制御を受ける可能性が有ること。

以上のように、本論文はヒトの DNA 修復機構や発癌機構の研究に対して、極めて有用な知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考えます。