

Title	分裂酵母のrhp4A/Bとrhp23の機能の研究
Author(s)	比山, 英樹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/42276">http://hdl.handle.net/11094/42276</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	比 山 英 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 6 1 6 3 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	分裂酵母の rhp 4 A/B と rhp23 の機能の研究
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

DNA 損傷は様々な DNA 代謝反応を阻害する原因となり、突然変異で誘発される老化や癌化、細胞死につながる。太陽光に含まれる紫外線は、生物が比較的さらされる頻度の高い損傷要因だが、生物は紫外線損傷に対する修復機構を、進化の過程で獲得してきた。第一の経路は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) である。ほとんど全ての生物種で高度に保存されており、さらに 2 種類の副経路、転写と共役した速い修復 (transcription-coupled repair : TCR) とゲノム全体で行われる遅い修復 (global genome repair : GGR) が知られている。第二の経路は、光に依存した反応で紫外線損傷を修復する光回復酵素で、ヒトや分裂酵母には存在しないが幅広い生物種で保存されている。一方、分裂酵母やアカパンカビなど一部の生物種にしかみられない第三の経路に、UV 損傷に特異的なエンドヌクレアーゼを介する修復機構、紫外線損傷除去修復 (UV damage excision repair : UVER) がある。

本研究では、以下の点から研究の対象に分裂酵母を用いた。1) 出芽酵母とは異なり、紫外線損傷に対して働く 2 種類の除去修復反応 NER と UVER が存在し、紫外線に対する両除去修復機構の関係が解明されていない、2) 遺伝子型や機能因子などが出芽酵母に比べてヒトなどの哺乳類に近い、3) 遺伝学的解析が容易で、特に細胞周期の研究について、チェックポイント機構、染色体の分配など、DNA 修復と密接に関わる事象の理解が進んでいることである。この DNA 修復のネットワークを明らかにできる可能性を秘める分裂酵母について、UVER に比べて研究の遅れている、NER の研究に取り組んだ。

分裂酵母の NER 因子についてゲノムデータベース上での解析から、出芽酵母やヒトとは違い、分裂酵母では 2 種類の RAD 4 ホモログを rhp 4 A/B として新規に単離した。RAD 4 と複合体を形成する NER 因子 RAD23 の分裂酵母ホモログ rhp23 も併せて単離した。本研究では、rhp 4 A/B と rhp23 について、生化学と遺伝学の両手法により、機能解析を行なった。

出芽酵母では RAD 4 が RAD23 と、ヒトでは XPC が HR23 と複合体を形成し、形成された複合体が損傷 DNA に強い親和性を示すこと、又その機能は RAD 4 /XPC が担っていることが示されている。そこで rhp 4 A/B と rhp 23 の生化学的解析では、大きく 2 つの問題、a) RAD 4 と RAD23 ホモログ間で蛋白質の性質が保存されているか、b) アミノ酸レベルで 56% の相同性を示す rhp 4 A/B 間で蛋白質の性質が異なるか、について検討した。

実験の結果から明らかにしたことは、1) rhp 4 A/B と rhp23 とが複合体を形成する、2) rhp 4 B は紫外線損傷

DNA に親和性を示すが、rhp23では親和性を示さない、3) rhp 4 A-rhp23と rhp 4 B-rhp23共に複合体として、紫外線損傷 DNA に親和性を示すことである。以上の生化学的解析から、rhp 4 A/B と rhp23について、出芽酵母とヒトのホモログ間でみられる複合体形成能及び紫外線損傷 DNA への親和性については保存されているが、rhp 4 A/B 間の機能的な差異は見られなかった。しかし、この様に損傷 DNA に対して等しく結合能を示す場合でも、出芽酵母 RAD 4 とヒト XPC の細胞内での機能は異なっており、RAD 4 は NER の TCR と GGR の両方に、一方 XPC は GGR に特異的であることが示されている。この問題については、さらに遺伝学的解析で検討を行なった。

遺伝学的解析では、rhp 4 A/B がどの DNA 修復経路に働いているかを、単独破壊及び二重破壊株の紫外線に対する感受性を指標としたエピスタシス解析を中心に研究を行なった。尚、rhp23が NER の TCR と GGR に働くこと、uvde が UVER で中心的な働きをすること及び出芽酵母 RAD 2 の分裂酵母ホモログ rad13が、NER 以外に塩基除去修復にも関与する多機能修復因子である可能性についての知見は、すべて他のグループの報告による。

rhp 4 A/B と rhp23の単独及び二重破壊株を用いた解析から明らかになったことは、1)  $\Delta$ rhp 4 A 株と  $\Delta$ rhp23 株では紫外線に感受性を示したが、 $\Delta$ rhp 4 B 株は感受性を示さなかったこと、2) rhp 4 A/B 間では異なる機能を有すること、3) rhp 4 A が NER 以外の経路に関与すること、4) rhp23の破壊は致死ではないが、細胞の生存もしくは増殖に影響が出ることである。分裂酵母では、NER の GGR に特異的な遺伝子の破壊株で紫外線感受性を示さないことが報告されている。このことから、rhp 4 B が NER の GGR に特異的に働く因子である可能性が示唆された。

UVER との関係について、uvde との二重破壊から明らかになったことは、1) rhp 4 A と rhp23は UVER とは異なる経路で働くこと、2) rhp 4 B と uvde との二重破壊では明らかな紫外線感受性の増大を示さなかったことである。NER の GGR に特異的な因子と uvde との二重破壊では、紫外線感受性の増大を示すという知見から、2) については rhp 4 B の機能を rhp 4 A が相補した結果である可能性が考えられた。また、rhp 4 A が多機能である可能性について検討した rad13との二重破壊からは、以下のことが強く示唆された。1) rhp 4 A が NER に働くこと、2) rad13と同じく塩基除去修復へ関与することである。

以上の結果から、今回検討した二重破壊株について、大きく2つの表現型に分類することができた。1) 紫外線量が50J/m<sup>2</sup>付近で細胞が死滅するグループで、NER 欠損株が、更に UVER 以外の修復を欠損した場合に共通の表現型である。2) 著しい感受性を示し紫外線量が20J/m<sup>2</sup>付近の低線量域で死滅するグループで、NER と UVER の両者を欠失したことによる。従って、1) に属する  $\Delta$ rhp 4 A- $\Delta$ rhp 4 B 株は NER の GGR と TCR に異常があることになり、rhp 4 B が GGR にのみ働いていると予想されることから、rhp 4 A は、少なくとも NER の TCR に、あるいは、TCR と GGR の両経路に機能していると考えられる。rhp 4 A については、更に塩基除去修復で機能していることを示す結果を得た。これは、出芽酵母やヒトのホモログでは知られていない新しい知見である。

本研究では出芽酵母の NER 因子 RAD 4 と RAD23の分裂酵母ホモログとして単離した rhp 4 A/B と rhp23について、生化学と遺伝学の両手法により DNA 修復における役割を中心に研究を進めてきたが、rhp23を破壊すると細胞の生存に影響が出るという知見も得ており、今後の更なる解析から、DNA 修復機構と細胞周期の有機的なつながりを解明する上で、本研究が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

紫外線 (ultraviolet light : UV) は、生物の生存を考える上で極めて重要な環境因子である。UV によって DNA 上に損傷が生じると DNA の複製や転写といった DNA 代謝に影響を及ぼし、ひいては変異や細胞死の原因となる。そこで生物は進化の過程で UV 損傷を取り除く複数の経路を獲得してきた。第一の経路としては、広範な損傷の除去に働くヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair : NER) がある。第二の経路として光回復酵素による直接的な修復があるが、ヒトや分裂酵母では存在しない。一方、分裂酵母やアカパンカビなど一部の生物種にしか見られない第三の経路として、UV 損傷特異的なエンドヌクレアーゼを介する紫外線損傷除去修復 (UV damage excision repair : UVER) が存在する。

著者は、遺伝学的な解析が容易で細胞周期の研究などは非常に進んでいる分裂酵母において、NERの研究が進んでいないことに着目し、UV損傷に対するNER、UVER、あるいはその他の修復経路の関連を探るべく実験を行った。その結果、以下のような成果が得られた。

- 1) 出芽酵母RAD4（ヒトではXPC）の分裂酵母ホモログを検索し、分裂酵母にはRAD4ホモログが2種類存在することを明らかにした。それぞれrhp4A、rhp4Bと名付けた（rhp: rad homolog in *pombe*）。
- 2) 出芽酵母においてRAD4と複合体を形成しているRAD23（ヒトではHR23B）の分裂酵母ホモログを検索し、1種類の存在を明らかにした（rhp23と名付けた）。
- 3) 昆虫細胞でrhp4Aとrhp4Bをそれぞれrhp23との複合体として発現することに成功し、いずれの複合体も出芽酵母のRAD4/RAD23複合体、ヒトXPC/HR23B複合体と同様、DNA結合活性を有すること、特に損傷DNAに強い結合能を示すことを明らかにした。
- 4) rhp4A、rhp4B、rhp23のいずれも分裂酵母の生存に必須ではなかった。またそれぞれ単独の破壊株でUV感受性を調べた結果、rhp23欠損株が最もUVに感受性で、rhp4A欠損株は若干感受性、そしてrhp4B欠損株はUVに感受性が見られなかった。
- 5) 二重破壊株を用いた実験から、rhp4Bとrhp23とは同じ修復経路（NERと思われる）、そしてrhp4Aとrhp23、rhp4Aとrhp4Bとは部分的に同じ経路で働くが、別の経路でも働いていることが示唆された。
- 6) UVER経路で働くuvde（UV damage endonuclease）との二重破壊の結果から、rhp4A、rhp4B、rhp23のいずれもがUVER経路とは別の修復経路で働いていることが明らかとなった。
- 7) これらの結果から、分裂酵母には、NER経路、UVER経路以外の修復経路がUV損傷の修復に関わっている可能性が示唆された。

以上のように、本論文はDNA修復機構や発がん機構の研究に有用な知見を与えており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考えます。