



Title	分裂酵母のrhp4A/Bとrhp23の機能の研究
Author(s)	比山, 英樹
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42276
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

氏名	ひ比山英樹
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第16163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rhp4A/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、転写と共に役した速い修復(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RAD4ホモログをrhp4A/Bとして新規に単離した。RAD4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、rhp4A/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RAD4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RAD4/XPCが担っていることが示されている。そこでrhp4A/Bとrhp23の生化学的解析では、大きく2つの問題、a) RAD4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rhp4A/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) rhp4A/Bとrhp23とが複合体を形成する、2) rhp4B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) rhp4A-rhp23とrhp4B-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、rhp4A/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、rhp4A/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RAD4とヒトXPCの細胞内での機能は異なっており、RAD4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、rhp4A/BがどのDNA修復経路に働くかを、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RAD2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。

rhp4A/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) Δrhp4A株とΔrhp23株では紫外線に感受性を示したが、Δrhp4B株は感受性を示さなかったこと、2) rhp4A/B間では異なる機能を有すること、3) rhp4A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、rhp4B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) rhp4Aとrhp23はUVERとは異なる経路で働くこと、2) rhp4B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rhp4Bの機能をrhp4Aが相補した結果である可能性が考えられた。また、rhp4A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) rhp4A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/m²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/m²付近の低線量域で死滅するグループで、NERとUVERの両者を消失したことによる。従って、1)に属するΔrhp4A-Δrhp4B株はNERのGGRとTCRに異常があることになり、rhp4BがGGRにのみ働いていると予想されることから、rhp4A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。rhp4A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RAD4とRAD23の分裂酵母ホモログとして単離したrhp4A/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、分裂酵母やアカバ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 RAD 4 (ヒトでは XPC) の分裂酵母ホモログを検索し、分裂酵母には RAD 4 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 rhp 4 A、rhp 4 B と名付けた (rhp : rad homolog in *pombe*)。
- 2) 出芽酵母において RAD 4 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 rhp 4 A と rhp 4 B 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 RAD 4 / 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) rhp 4 A、rhp 4 B、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、rhp 4 A 欠損株は若干感受性、そして rhp 4 B 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、rhp 4 B と rhp23 とは同じ修復経路 (NER と思われる)、そして rhp 4 A と rhp23、rhp 4 A と rhp 4 B 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、rhp 4 A、rhp 4 B、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る。