

Title	Characterization of DNA Recognition by the Human UV-damaged DNA-binding Protein
Author(s)	藤原, 芳江
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43229
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	藤原芳江
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16666 号
学位授与年月日	平成14年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Characterization of DNA Recognition by the Human UV-damaged DNA-binding Protein (ヒトの UV-damaged DNA-binding protein による損傷 DNA 認識の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 品川日出夫 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

【目的】

細胞は DNA 中に生成する様々な損傷を修復する機構を備えている。最もよく知られた紫外線損傷の主要産物である (6-4) 光産物はヌクレオチド除去修復 (NER) により修復される事が明らかとなっている。我々は、NER の過程において、この損傷を認識する主要な蛋白質に興味を持ち、動物細胞から生化学的に同定することを試みた。その結果、一つの認識蛋白質を検出、同定した。更に、この分子の認識機構を DNA の高次構造の観点から解明することを目指していくつかの実験を行った。

【方法ならびに成績】

1. (6-4) 光産物へ結合する因子の探索と精製

(6-4) 光産物を一か所含む49bp の ^{32}P で標識した DNA 断片を用いて、バンドシフト法により HeLa 細胞核抽出液中の損傷認識蛋白質を検索した。最も強いシグナルを与えた蛋白質は非標識の損傷 DNA 断片で著しく結合を阻害されたことから、これが (6-4) 光産物の主要認識蛋白質であると考えた。(6-4) 光産物をリガンドに使用したアフィニティークロマトグラフィーを含め、3 種類のカラムクロマトグラフィーによりこの蛋白質を精製し、限定分解にかけて内部アミノ酸配列を調べた結果、127kDa、48kDa の 2 サブユニットから構成される UV-damaged DNA-binding protein (UV-DDB protein) であると同定した。

2. UV-DDB protein が結合する損傷の同定と損傷認識機構の解析

UV-DDB protein が認識する損傷を同定するためバンドシフト法で種々の損傷を含む DNA への結合を調査したところ、(6-4) 光産物以外にシクロブタン型ピリミジンダイマー、脱塩基部位、シスプラチン付加体を含む DNA を認識した。UV-DDB protein は (6-4) 光産物に特に強く結合したが、脱塩基部位にも比較的強く結合した。(6-4) 光産物を含む DNA はその部位で折れ曲がっているとの報告があることから、UV-DDB protein は折れ曲がった DNA と結合するのではないかと推測された。しかしながら脱塩基部位を含む DNA 構造には折れ曲がりのあるものと無いもの両方が報告されているため、今回用いた脱塩基部位を含む DNA の水溶液中での全体構造を調べた。DNA を蛍光ラベルして fluorescence resonance energy transfer (FRET) を解析したが、折れ曲がりには観察されなかった。蛋白質-DNA 複合体形成後の DNA の折れ曲がり circular permutation 法を用いて検討した結果では、(6-4) 光産物、脱塩基部位を含むどちらの損傷 DNA も約55°曲げられていることが明らかとなった。

【総括】

(6-4) 光産物を含むプローブを使用することにより、ヒト細胞中でこの損傷を認識する蛋白質 UV-DDB protein を同定した。UV-DDB protein は特に (6-4) 光産物に結合することに加えて、シクロブタン型ピリミジンダイマー、脱塩基部位、シスプラチン付加体を含む DNA 二重鎖も認識した。このタンパクが (6-4) 光産物、脱塩基部位を含む損傷 DNA に結合したときには DNA は曲げられているが、非結合時には後者の DNA に明確な折れ曲がりには観察されない。それ故、この蛋白質は、本来曲がっている DNA だけではなく、結合によって折れ曲がり誘起される DNA をも認識可能であることが結論された。

更に、現在では (6-4) 光産物を含む DNA も水溶液中では曲がっていないことが FRET により示されたことから(参考論文)、UV-DDB protein は約 55° に折れ曲がり可能な構造を認識するものと考えている。

論文審査の結果の要旨

UV-DDB タンパク質 (UV-damaged DNA-binding protein) は、紫外線照射された DNA に強く結合するタンパク質として分離されたもので、皮膚がんを高頻度に発症するヒト遺伝病である色素性乾皮症 E 群の原因遺伝子産物と考えられている。このタンパク質は、紫外線などによる DNA 損傷の修復に働くヌクレオチド除去修復機構の最初のステップ、すなわち損傷の認識に働いていると予想されているが、DNA のどのような構造を認識するのかなど十分に解明されていない。そこで本研究では、UV-DDB タンパク質の損傷認識機構を DNA の全体構造の観点から明らかにすることを目的とした。

まず特定の損傷を持つ DNA を調製し、このタンパク質が認識出来る損傷の種類を検索したところ、(6-4) 光産物に強く結合するほか、脱塩基部位アナログに比較的強く、またシクロブタン型光産物、シスプラチン付加体にも弱いながら結合した。(6-4) 光産物やシスプラチン付加体を含む DNA は、損傷部位で大きく折れ曲がっていることが知られており、UV-DDB タンパク質が DNA の折れ曲がり認識しているのではないかと考えられた。そこで FRET 法により水溶液中での DNA の全体構造を、また circular permutation 法により DNA と UV-DDB タンパク質との複合体形成後の DNA の折れ曲がり調べた。その結果、UV-DDB タンパク質は本来折れ曲がっている DNA だけを認識するのではなく、自身の結合によって折れ曲がり誘起される DNA をも認識することが出来ることを明らかにした。

以上のように、本研究は UV-DDB タンパク質が複数の損傷を認識するユニークな様式を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものとする。