The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix : possible relevance to transcription-coupled DNA repair
Author(s)	神内, 伸也
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43710
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

【18】

氏　　名	神内伸也（かみうち しんや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16815　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Translocation of Cockayne syndrome group A protein to the nuclear matrix: possible relevance to transcription-coupled DNA repair （CSA蛋白質の核マトリックス移行は転写と共役したDNA修復機構に関与している）
論文審査委員	（主査） 教　授　田中亀代次 （副査） 教　授　花岡　文雄　　教　授　米田　悦啓

論文内容の要旨

【目的】

ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair；NER）は、紫外線や種々の化学物質などによるDNA損傷を修復する機構の一つであり、種および個体の存続において重要な役割を果たすものである。NERには、転写されている鋳型鎖上の損傷を速やかに修復し、DNA損傷によって停止した転写を再開させる「転写と共役したDNA修復」（transcription-coupled repair；TCR）と、それ以外の部位のDNA損傷を修復する「ゲノム全体のDNA修復」（global genome repair；GGR）の2つの副経路がある。NERに異常を持つヒト遺伝疾患として、色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum；XP）、コケイン症候群（Cockayne syndrome；CS）、硫黄欠乏症毛髪発育異常症（trichothiodystrophy；TTD）などが知られている。このうち、CSはTCRを選択的に欠損することが明らかになっている。CSには2つの遺伝的相補性群が存在し、それぞれの遺伝子（*CSA*、*CSB*）が単離されているが、これら因子の機能の詳細は明らかではない。一方で、TCRは紫外線などによる損傷の他に酸化的損傷の修復でもその存在が確認されている。しかしながら、TCRの分子機構は未だ不明である。我々は、A群CSの原因遺伝子産物であるCSA蛋白質のTCRにおける役割を検討するために、ヒト培養細胞でのCSA蛋白質の細胞内局在を解析した。

【方法・結果】

細胞をTriton X-100およびDNase I、NaClを用いて分画した結果、紫外線照射した正常細胞では、CSA蛋白質は、その一部が核マトリックスへ移行することが明らかとなった。しかし、他のNER因子の核マトリックスへの移行は認められなかった。CSA蛋白質の核マトリックスへの移行は、GGRおよびTCRに共通の因子であるXPAや、GGRに特異的な因子であるXPCが欠損している細胞では、修復能が正常な細胞と同様に紫外線照射によってその移行が認められたのに対して、TCR因子であるCSBが欠損している細胞では認められなかった。しかし、CSBが欠損している細胞にCSB cDNAを導入してTCR能を正常化した細胞ではCSA蛋白質の移行が認められた。生細胞中でのCSA蛋白質の局在を多重蛍光抗体染色法により調査したところ、紫外線非照射の細胞ではTriton X-100処理によりCSA蛋白質の蛍光像が観察できなかった。しかしながら、紫外線照射した細胞ではTriton X-100処理および、Triton X-100とDNase I処理でCSA蛋白質の蛍光像が観察され、その局在は核内にドット状のいわゆる“speckle”として観察された。また、CSA蛋白質は紫外線照射した細胞の核マトリックスでリン酸化RNAポリメラーゼIIと

局在が一致することが明らかとなった。さらに、CSA 蛋白質の核マトリックスへの移行は、TCR で修復される損傷を生成するシスプラチンや過酸化水素で処理した細胞でも認められるのに対して、TCR では修復されない損傷を生成する硫酸ジメチルで処理した細胞では認められなかった。過酸化水素で処理した細胞での CSA 蛋白質の核マトリックスへの移行は、紫外線照射した細胞と同様に、TCR 因子である CSB を欠損している細胞では認められなかったが、CSB 欠損細胞に CSB cDNA を導入して TCR 能を正常化した細胞では認められた。

【総括】

CSA 蛋白質は、紫外線照射した細胞において特異的に核マトリックスへ移行することが明らかとなった。また、この移行は NER での TCR のみならず、酸化的損傷の TCR にも密接に関与していることが明らかとなった。さらに、CSA 蛋白質の核マトリックスへの移行は、TCR に特異的な因子である CSB に依存していることが明らかとなった。紫外線照射した細胞において核マトリックスに移行した CSA 蛋白質は、転写伸長に関わるリン酸化 RNA ポリメラーゼⅡと局在が一致したことから、核マトリックスにおいてなんらかの相互作用を行っている可能性が示された。これらの結果は、CSA 蛋白質の核マトリックスへの移行が TCR に特異的な反応段階で起こる現象であること、TCR と核マトリックスが CSA 蛋白質を介して重要な関連をもつことを示唆している。

論文審査の結果の要旨

ヒトを含めた全ての生物は、外的あるいは内的因子により生じた DNA 損傷を見つけて修復する多様な機構を進化の過程で獲得してきた。その修復機構に関わる因子の欠損は、ヒトでは高発癌、早期老化、種々の神経性疾患、免疫異常などの重篤な病態をもたらす。コケイン症候群（CS）は、稀なヒト常染色体劣性遺伝疾患で、ヌクレオチド除去修復（NER）機構の 2 つの副経路のうち、活性化遺伝子領域の転写鎖上にある損傷を修復する「転写と共役した DNA 修復」(transcription-coupled repair；TCR）を選択的に欠損している。CS には、A、B 群の 2 つの遺伝的相補性群が存在し、それぞれの原因遺伝子（*CSA*、*CSB*）は単離されたものの、その遺伝子産物の機能および TCR の分子機構の詳細は不明である。従って、TCR を解明する上で、CS 蛋白質の機能の解明が重要である。本研究では、紫外線照射および過酸化水素で処理した細胞では、CSA 蛋白質が核マトリックスに特異的に移行すること、さらに CSA 蛋白質の核マトリックスへの移行が CSB 蛋白質に依存していることを明らかにした。この結果は、DNA 損傷による CSA の核マトリックスへの移行が TCR に密接に関与した現象であることを示唆すると共に、TCR と核マトリックスとの関連および、CSA と CSB の interplay を初めて明らかにしたものである。

以上の知見は、CSA の機能や TCR の分子機構の解析に重要な貢献をするものであり、学位の授与に値すると考えられる。