

Title	Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase
Author(s)	清水, 祐一郎
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/43885
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏 名 清 水 祐 一 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 5 9 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 5 年 3 月 2 5 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 Xeroderma pigmentosum group C protein interacts physically and functionally with thymine DNA glycosylase.
(C 群色素性乾皮症蛋白質とチミン DNA グリコシラーゼの機能的相互作用)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 花 岡 文 雄

(副査)

教 授 杉 野 明 雄 教 授 田 中 亀 代 次

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ヌクレオチド除去修復 (NER) は紫外線等によって誘起される様々な DNA 損傷を修復する機構である。NER 能の欠損を伴うヒトの遺伝疾患として色素性乾皮症 (XP) 等が知られており、XP-A~G の 7 つの遺伝的相補性群が NER 機構に何らかの欠損を示す。このうち XP-C 群で欠損している XPC-HR23B 複合体は、ゲノム全体で働く NER 副経路 (GG-NER) で必須な機能を果たす一方、転写と共役した NER 副経路 (TC-NER) には必要でないことが示されている。近年の生化学的解析により、XPC-HR23B 複合体は DNA 損傷によって誘起される DNA の構造異常を認識して結合し、GG-NER 反応を開始する因子であることが明らかになった。一方、細胞内の状況を考えた場合、他のタンパク質が XPC-HR23B と相互作用することによって損傷認識の効率を高めたり、NER 以外の新たな機能を賦与している可能性が考えられた。

そこで本研究では、XPC と相互作用する因子を探索し、その相互作用の意義を検討することにより、新たな XPC の機能を解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

酵母 2 ハイブリッド法を用い、XPC と相互作用する新規因子の探索を行ったところ、その候補としてチミン DNA グリコシラーゼ (TDG) が得られた。脊椎動物のゲノム中の CpG 配列に高頻度で見られるメチル化シトシンは、脱アミノ化によってチミンに変換し、その結果 G/T ミスマッチが生じる。TDG は、この G/T ミスマッチに結合してチミンを取り除き、塩基除去修復 (BER) 反応を開始する DNA グリコシラーゼである。まず、精製した XPC と TDG の組換えタンパク質を用いて共沈実験を行い、両者が物理的に直接相互作用していることを確認した。また、ゲルシフト法を用いた結合実験の結果、XPC-HR23B 単独では G/T ミスマッチに結合できないのに対して、TDC を予め G/T ミスマッチに結合させておくと、XPC-HR23B を含む三者複合体が形成されることが分かった。次に、TDG の活性に対する影響を試験管内活性測定系を用いて調べたところ、XPC-HR23B の用量依存的に TDG 活性の促進が見られた。TDG は G/T ミスマッチからチミンを除去した後、その反応産物である脱塩基部位 (AP サイト) に強固に結合し

続けるため、低酵素量の条件で反応を行うと、ある時点から反応産物が増加しなくなる現象が見られる。一方、その状態で XPC-HR23B を加えると、その時点から反応産物が再び増加することから、XPC-HR23B は AP サイトからの TDG の解離を促し、新たな基質との反応を可能にすることで活性を高めていると考えられた。一方、BER において TDG の次のステップで働く因子は AP エンドヌクレアーゼ (APE) であるが、APE も TDG を AP サイトから解離させる活性を有することが報告されている。そこで、XPC-HR23B と APE を同時に加えてみたところ、両者は TDG の活性に対して相加的な促進効果を示すことが分かった。また、同様の反応条件下では、APE による AP サイトの切断活性は XPC-HR23B によって阻害されないことが確認された。これらの結果は、従来 NER に特異的に関与する因子であると考えられていた XPC-HR23B が、TDG との相互作用を介して別の DNA 修復経路である BER にも関与している可能性を示唆している。

【総括】

これまでに XP-C 群患者由来のがん細胞、もしくは *XPC* 遺伝子欠損マウスに紫外線を照射することによって得られた皮膚がん細胞を用いて *p53* 遺伝子の突然変異が詳細に解析されているが、検出された突然変異の大半はピリミジンが 2 個連続する部位での紫外線による損傷が原因と考えられる。その一方で、ピリミジン二量体が生じ得ない CpG 配列におけるシトシンからチミンへの点突然変異も見いだされており、これがメチル化シトシンの脱アミノ化によって生じる G/T ミスマッチを介している可能性が考えられる。本論文の結果は、XPC の欠損が GG-NER の喪失のみならず、TDG による C/T ミスマッチ修復能の低下をもたらすことによって突然変異の発生を促進する可能性を示唆しており、XP-C 群患者における発がん機構を理解する上で重要な意義を持つものと思われる。

論文審査の結果の要旨

C 群色素性乾皮症 (XP-C 群) で欠損している XPC-HR23B-centrin 2 複合体は、ヌクレオチド除去修復 (NER) の副経路の一つであるゲノム全体の修復において DNA 損傷を認識し NER 反応を開始することが、無細胞系を用いた解析から明らかになっている。一方、細胞内において、XPC が NER のみに働いているかどうかは明らかでなかった。

本論文において、酵母 2 ハイブリッド法によって XPC 蛋白質と相互作用する因子の探索を行ったところ、チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) が得られた。TDG は、メチル化シトシンが脱アミノ化によってチミンに変換した結果生じる G/T ミスマッチのチミンを取り除く塩基除去修復 (BER) 因子である。精製した組換え蛋白質を用いた解析から、XPC 複合体が TDG と直接相互作用するだけでなく、無細胞系において TDG 活性を促進することが示された。さらに、XPC 複合体はグリコシラーゼ反応の結果生じる脱塩基部位に結合した TDG の遊離を促すことによって活性を高める一方、BER の後の段階で働く AP エンドヌクレアーゼの活性には影響を与えないことがわかった。

これら一連の研究は、*XPC* 遺伝子の欠損が NER 能の喪失のみならず、TDG 活性の低下を介して自然突然変異の発生を促進する可能性を示唆しており、XP-C 群患者における発がん機構を理解する上で重要な意義を持つと思われるため、学位の授与に値すると考えられる。