OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | C群色素性乾皮症タンパク質の翻訳後修飾に関する研究 |
| Author(s) | 奥田, 友紀 |
| Citation | 大阪大学, 2004, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/44809 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

| | |
|---|---|
| 氏名 | 奥田友紀（おくだゆき） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（薬学） |
| 学位記番号 | 第 18637 号 |
| 学位授与年月日 | 平成16年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻 |
| 学位論文名 | C群色素性乾皮症タンパク質の翻訳後修飾に関する研究 |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教授 花岡 文雄<br>（副査）<br>教授 前田 正知　教授 山元 弘　教授 山口 明人 |


## 論文内容の要旨

C群色素性乾皮症（XPC）タンパク質は、細胞内において出芽酵母RAD23の哺乳類ホモローグであるHR23タンパク質（HR23AまたはHR23B）、およびcentrin2を含むヘテロ3量体として存在しており、ヌクレオチド除去修復（NER）における損傷認識に関与している。XPCタンパク質の大部分はHR23Bと結合しており、残りの一部がHR23Aと複合体を形成しているが、無細胞NER反応においては、XPC-HR23Bヘテロ2量体のみで十分な活性を発揮し、この複合体が損傷を認識して結合することが修復反応の開始に必須である。無細胞系を用いた解析により、XPC複合体の生化学的な性質が解明されてきた一方、この因子の細胞内における動態には不明な点が多く残されている。そこで、細胞内でDNA損傷が生じたときのXPCタンパク質の動態を明らかにすることを目的とし、XPCタンパク質の翻訳後修飾を中心として解析を行った。

ヒト正常線維芽細胞に紫外線を照射した後、新規のタンパク質合成を阻害した状態で、経時的に細胞抽出液を作製し、抗XPC抗体でイムノブロッティングを行った。その結果、XPCタンパク質の一部が紫外線照射に伴って、高分子量領域にシフトし、その後、シフトした分子種が減少すると共に、通常の移動度を示すバンドが再び増加した。このことから、紫外線照射に伴って、XPCタンパク質は可逆的な翻訳後修飾を受けることが示唆された。この現象は、非許容温度において、ユビキチン活性化酵素が不活化するFM3A細胞由来温度感受性変異株ts85細胞では認められなかったことから、紫外線照射に伴うXPCタンパク質の翻訳後修飾には、細胞のユビキチン化活性が必要であることが示唆された。さらに、FLAGタグを融合したXPCタンパク質を安定に発現する細胞株を作製し、これを用いてHAタグを融合したユビキチンを一過性に過剰発現した。この細胞に、紫外線を照射後、抗FLAG抗体による免疫沈降、および抗HA抗体によるイムノブロッティングを行うことにより、XPCタンパク質自身がユビキチン化を受けることが示された。一方、様々な細胞株に、紫外線を照射してXPCタンパク質の翻訳後修飾を観察したところ、XP-E群細胞、およびチャイニーズハムスター由来の培養細胞（V79およびCHO-K1）では、この修飾が起こらないことがわかった。これらの細胞は、いずれも損傷DNAに高い特異性を持って結合するDDB因子を欠損していることで知られる。ヒトのDDB因子のサブユニットの1つであるDDB2を、V79細胞で安定に過剰発現することにより、人工的にDDBの損傷DNA結合活性を賦与した細胞株では、紫外線照射に伴うXPCタンパク質の翻訳後修飾が観察されたことから、この現象はDDBの損傷DNA結合活性に依存していることがわかった。さらに、細胞抽出液、および精製タンパク質を用いた免疫共沈降実験により、XPCタンパク質とDDB2タンパク質の間に直接、物理的な相互作用が存在することが示された。DDB因子は従来、DDB1およびDDB2から成るヘテロ2量体として、精製、同定さ

れていたが、細胞内においては、さらに cullin 4A、Roc1 が結合することによって、DDB-ユビキチンリガーゼ複合体として機能する可能性が最近になって示唆された。そこで、精製タンパク質を用いた無細胞ユビキチン化反応を行った結果、DDB-ユビキチンリガーゼ複合体が、XPC タンパク質のポリユビキチン化を促進することが示された。ユビキチン化によって、XPC タンパク質の機能がどのように変化するかについては現時点では不明であるが、DNA 損傷に対する結合特異性やタンパク質間相互作用に対する影響が想定される。

一方、酵母2ハイブリッド法を使ったスクリーニングの結果、ユビキチン様タンパク質 SUMO-1、およびその修飾に関わる酵素である Ubc9、PIAS1（protein inhibitor of activated Stat 1）が、XPC タンパク質と相互作用する可能性が示された。FLAG-XPC タンパク質を安定に発現する細胞株で HA タグを融合した SUMO-1 を過剰発現することにより、XPC タンパク質が細胞内で実際に SUMO-1 化されること、また、その修飾部位が N 末端から 81 番目および 89 番目のリジン残基であることを明らかにした。しかしながら、これらのリジン残基をアルギニンで置換した変異 XPC タンパク質は、細胞内においてほぼ正常な NER 活性を示した。従って、XPC タンパク質の SUMO-1 化は、NER 機能に必須ではなく、細胞内局在や、NER 以外の DNA 修復機構に関与するのかもしれない。

哺乳類 RAD23 ホモローグは、XPC タンパク質に結合してこれを安定化するのに加えて、ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解の制御に関与することが報告されている。XPC タンパク質に対する2種類の RAD23 ホモローグの機能的な差異を検討するために、*HR23A/B* 遺伝子の一方、あるいは両方を欠損したマウス胎仔線維芽細胞（MEF）を用いて、内在性の XPC タンパク質の安定性をイムノブロッティングにより調べた。その結果、XPC タンパク質の安定化における HR23B の寄与は HR23A に比べてはるかに大きく、HR23B 単独の欠損により NER 活性の低下を招くことがわかった。一方、野生型 MEF の細胞抽出液中に存在する HR23 タンパク質を定量したところ、HR23B タンパク質の方が HR23A タンパク質よりも約 10 倍多く存在することが明らかになった。さらに、*HR23A/B* 2重欠損細胞を親株として、HR23A のみを過剰発現する細胞株を作製したところ、mXPC タンパク質の安定性、および NER 活性共に野生型とほぼ同程度にまで回復した。すなわち、2種類の RAD23 ホモローグによる XPC タンパク質の安定化、および XPC 複合体中での存在量の違いは、主に両者の発現レベルを反映したものであり、機能的には同等であることが強く示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ヌクレオチド除去修復（NER）において、C 群色素性乾皮症の原因遺伝子産物である XPC タンパク質は、ゲノム全体の修復の初期段階、すなわち損傷の認識に関わっていることが、主として無細胞 NER 系による研究から明らかになってきた。しかしながらその細胞内における動態は不明な部分が多く残されている。そこで著者は XPC タンパク質の翻訳後修飾を中心に、ヒト XPC タンパク質について解析し、以下のような結果を得た。

1）ウエスタンブロット法により、XPC タンパク質が紫外線照射に応じてポリユビキチン化を受けることを見い出した。但しこの修飾は可逆的で、紫外線照射後一定時間経過すると XPC タンパク質は非修飾型に復帰することから、プロテアソームによる分解は受けないと考えられる。DNA 上の紫外線損傷に強く結合する DDB 因子を欠損していることが知られているヒト XP-E 細胞やチャイニーズハムスター由来の培養細胞ではこの修飾が起こらないことから、この現象は DDB の損傷 DNA 結合活性に依存していることが判明した。

2）また XPC タンパク質と DDB とは直接相互作用することを見い出した。最近になって、DDB は cullin 4A や Roc1 と複合体を形成し、ユビキチンリガーゼ活性を示すことが報告されたが、この XPC タンパク質のポリユビキチン化は DDB ユビキチンリガーゼによって *in vitro* で促進された。このことは、損傷部位において XPC と DDB とが協調的に働いていることを示唆している。

3）一方、XPC タンパク質は、細胞内において SUMO-1 化も受けることが分った。SUMO-1 化されるリジンを他のアミノ酸に置き換えた XPC タンパク質も細胞内においてほぼ正常な NER 活性を示したことから、この SUMO-1 化は NER 以外の細胞機能に働いていることが示唆された。

以上のように、本論文はヒト XPC タンパク質の細胞内における動態に関して新たな知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考える。