The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	分裂酵母Ddblタンパク質複合体の単離と解析および複合体形成に関わる新規モチーフの探求
Author(s)	福本, 泰典
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46517
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

【11】

氏　　名	福本泰典（ふくもと やすのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　20249　号
学位授与年月日	平成18年3月24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Ddb1タンパク質複合体の単離と解析および複合体形成に関わる新規モチーフの探索**
論文審査委員	（主査） 教授　花岡　文雄 （副査） 教授　東　純一　教授　山口　明人　教授　岡部　勝

論文内容の要旨

ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair : NER）は原核生物から真核生物まで保存されているDNA修復機構の一つであり、ヒトにおいては、NER関連因子の異常は色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum : XP）やコケイン症候群（Cockayne's syndrome : CS）といった遺伝性疾患として古くから知られている。NERにはゲノム全体の修復を行う機構（global genomic repair : GGR）に加えて、転写と共役して、RNAポリメラーゼの進行を妨げるDNAの損傷を速やかに取り除く機構（transcription-coupled repair : TCR）が存在する。現在までに、GGRに関しては試験管内再構成系を用いて詳細な解析が行われているが、TCRに関しては依然としてそのメカニズムは謎に包まれている。CS-AおよびCS-B群の患者由来の細胞の解析から、CSAおよびCSBは転写と修復の共役に働くと考えられているが、その機能はいまだに明らかではない。

UV-DDB（UV-damaged DNA binding protein）は、DDB1とDDB2からなるヘテロダイマーとして単離され、XPCとともにGGRの損傷認識段階に関わると考えられてきた。しかし、近年DDB1はcullin 4Aと相互作用し、DDB2あるいはCSAとともにユビキチンリガーゼ（E3）複合体を形成することが示され、さらに、DDB1/cullin 4A E3複合体はDNA複製のライセンス化因子や転写因子のユビキチン化を行うことが明らかとなり、DDB1の機能におけるユビキチン－プロテアソーム経路の重要性に興味がもたれている。*DDB2*の変異はXP-E群を生じることが示されているが、一方で、現在までに*DDB1*の変異を伴う遺伝性疾患は見つかっておらず、その*in vivo*における解析は大きく遅れていた。そこで我々は、分子遺伝学的実験や細胞生物学的実験に優れ、特に細胞周期研究のモデル生物として先導的な役割を保ってきた、分裂酵母におけるヒト*DDB1*ホモログ、*ddb1*$^{+}$ の解析を開始した。

分裂酵母 Ddb1 を含むタンパク質複合体を単離した結果、cullin4A の分裂酵母ホモログ Pcu4 に加えて、4つのWD40リピートを持つタンパク質が単離された。WD40リピートを持つタンパク質のひとつは、その一次配列からヒトCSAの分裂酵母ホモログと推定され、Ckn1と命名した。もうひとつは、過去にDNA複製への関与が示されている既知の因子、Cdt2（Cdc10-dependent transcript 2）であった。残り二つは新規の因子で、その分子量からそれぞれp48およびp92と命名した。

分裂酵母においてDdb1とそれぞれのWD40リピートタンパク質を共発現させ、その細胞抽出液から免疫沈降し、Ddb1と個々のWD40リピートタンパク質との相互作用を確認したところ、Ddb1と個々のWD40リセートタンパク

質との相互作用が確認された。またグリセロール密度勾配遠心法による過剰発現および内在性のタンパク質の解析から、Ckn1は*in vivo*において恒常的にDdb1と複合体を形成しているものと思われた。

それぞれの遺伝子破壊株の紫外線損傷DNAの修復能を検討した結果、*ddb1*$^+$と*ckn1*$^+$は、ヒト*CSB*/出芽酵母*Rad26*の分裂酵母ホモログ、*rhp26*$^+$とともに、NERのTCRに働くことが示された。さらに、*rhp26*$^+$は、転写と修復の共役に先立ってDNAの損傷部位で停止したRNAポリメラーゼIIの損傷部位からの除去に働き、一方で、*ckn1*$^+$は、おそらく*ddb1*$^+$および*pcu4*$^+$とともに、損傷部位への修復因子の積極的なリクルート、つまり転写と修復の共役に働く可能性が示された。

分裂酵母p48はDdb1と相互作用する塩基性のWD40リピートタンパク質であったため、ヒトDDB2の分裂酵母ホモログであることが当初予想されたが、ゲノムデータベースの解析からヒトWDR21がp48のホモログである可能性が考えられた。昆虫細胞においてヒトDDB1とヒトWDR21を共発現し、免疫沈降によって相互作用を確認したところ、DDB1とWDR21の共沈が確認され、ヒトWDR21が分裂酵母p48のヒトホモログであると考えられた。分裂酵母において過剰発現し、その細胞抽出液から精製したDdb1/p48複合体はゲルろ過において分子量約160 kDaを示し、Ddb1とp48はDDB1/DDB2と同じく、ヘテロダイマーを形成するものと思われた。一方、*p48*$^+$の破壊株はCPDの修復能の低下も紫外線感受性の亢進も示さなかった。そのほか*p48*$^+$破壊株はシスプラチン、ヒドロキシウレア、MMS、TBZ、過酸化水素、ブレオマイシンに対しても感受性は示さなかった。

ところで、非常によく解析されたE3であるSCF (Skp1-cullin 1/Cdc53-F-box protein) などとのアナロジーから、WD40リピートを持つDDB2およびCSAは、E3への基質タンパク質のリクルートに働くアダプタータンパク質であると考えられており、やはりSCFなどとのアナロジーから、このアダプタータンパク質には、DDB1との相互作用に関わる共通のモチーフ“Xボックス”が存在する可能性が考えられている。

ヒトDDB1はいくつかのウィルス由来のタンパク質と相互作用し、またこの相互作用がウィルスの感染や増殖に必須あるいは重要であるケースが報告されている。B型肝炎ウィルスのXタンパク質（hepatitis B virus X protein : HBx）は、やはりDDB1と相互作用し、DDB1とHBxの相互作用がB型肝炎ウィルスの感染に重要であることが示されている。

一次配列の解析からHBxのDDB1結合領域に相同性を示す配列がWDR21に見出され、このHBx相同領域の欠失および点変異体の解析から、この領域がDDB1との相互作用に関わっている可能性が示唆された。このHBx相同領域に類似の配列が分裂酵母において単離された他のWD40リピートタンパク質にも確認され、それぞれの欠失および点変異体の解析から、この領域のアミノ酸配列がDDB1との相互作用に重要である可能性が示された。これらの結果に基づいて、HBxのDDB1結合領域に相同性を示し、分裂酵母において単離されたWD40リピートタンパク質とそのヒトホモログに共通して存在する配列が“X-box”である可能性を考えている。

論文審査の結果の要旨

UV-DDB（UV-damaged DNA binding protein）は、DDB1とDDB2からなるヘテロダイマーとして単離され、XPCとともにGGRの損傷認識段階に関わると考えられてきた。しかし、近年DDB1はcullin 4Aと相互作用し、DDB2あるいはCSAとともにユビキチンリガーゼ（E3）複合体を形成することが示され、さらに、DDB1/cullin 4A E3複合体はDNA複製のライセンス化因子や転写因子のユビキチン化を行うことが明らかとなり、DDB1の機能におけるユビキチン－プロテアソーム経路の重要性に興味がもたれている。本研究では、モデル生物として分裂酵母を選び、Ddb1を含むタンパク質複合体を単離・解析し、以下のような結果を得た。

1）分裂酵母Ddb1タンパク質複合体に含まれるタンパク質として、cullin4Aの分裂酵母ホモログPcu4およびWD40リピートを持つ4つの未知タンパク質が同定された。その一つはヒトCSAホモログのCkn1、もうひとつはDNA複製への関与が示唆されているCdt2で、残りの二つは新規の因子で、p48およびp92と命名した。

2）遺伝子破壊株の解析から、*ddb1*$^+$と*ckn1*$^+$は、ヒトCSB/出芽酵母Rad26の分裂酵母ホモログ、*rhp26*$^+$とともにNERのTCRに働くことが示された。一方、*p48*$^+$の破壊株は紫外線その他のDNA障害剤に対して感受性を示

さなかった。

3）ゲノムデータベースの解析からヒト WDR21 が p48 のホモログである可能性が考えられ、一次配列の解析から、B 型肝炎ウイルスの X タンパク質（hepatitis B virus X protein : HBx）の DDB1 結合領域に相同性を示す配列が WDR21 に見出された。この HBx 相同領域の欠失および点変異体の解析から、この領域が DDB1 との相互作用に関わっている可能性が示唆された。

以上のように、本論文は分裂酵母 Ddb1 タンパク質の機能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。