

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、 〈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	福本 泰典
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 リピートタンパク

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、プ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 リピータンパク質を持つ 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 はいくつかのウイ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イ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型肝炎ウイルスの 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型肝炎ウイ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をもたれている。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 *Peu4* および WD40 リピータンパク質を持つ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

さなかつた。

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する。