

Title	哺乳類ヌクレオチド除去修復の損傷認識に関わる細胞内制御機構の研究
Author(s)	西, 良太郎
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46518">https://hdl.handle.net/11094/46518</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	西 良太郎
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20247 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	哺乳類ヌクレオチド除去修復の損傷認識に関わる細胞内制御機構の研究
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 宇野 公之 教授 東 純一 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

遺伝情報を保持する DNA を安定に維持することは生物にとって極めて重要である。しかしながら、細胞中の DNA は DNA 自身の不安定性に加え、紫外線などの外的要因、及び活性酸素などの内的要因により常に損傷を受ける危険に曝されている。DNA 上に生じた損傷は突然変異の原因となり、細胞の癌化を引き起こす他、転写や複製などの DNA 代謝反応を直接的に阻害することにより細胞死を引き起こす。これらの有害な反応を回避するために、生物は進化の過程で様々な DNA 修復機構を獲得してきた。なかでも、ヌクレオチド除去修復機構 (nucleotide excision repair ; NER) は紫外線によって生じる損傷である (6-4) 光産物やシクロブタン型ピリミジンダイマー等を対象とする広範な基質特異性を有する重要な DNA 修復機構である。ヒトでは NER に欠損を示す代表的な遺伝病として色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) が知られている。XP は八つの遺伝的相補性群に分類され、現在までに XP の責任遺伝子はすべて同定されている。哺乳類の NER はゲノム全体を対象とした副経路 (global genome NER ; GG-NER) と転写と共役した副経路 (transcription-coupled NER ; TC-NER) から構成されており、それぞれの副経路においては損傷の認識機構が異なる。GG-NER において損傷の認識に関わる XPC は出芽酵母 Rad23 の哺乳類ホモログ (HR23A もしくは、HR23B) 及び、中心体蛋白質として知られる centrin 2 を含むヘテロ三量体として存在する。Centrin 2 は、比較的最近になって新たに XPC 複合体に含まれることが明らかになった蛋白質であり、XPC の熱安定性を若干上昇させることが報告されているほかは、NER におけるその生化学的な機能はこれまでほとんど明らかになっていなかった。

Centrin は単細胞緑藻類の鞭毛器官中に同定された約 18 kDa の酸性蛋白質であり、酵母からヒトに至るまで高度に保存された蛋白質である。ヒトでは少なくとも centrin 1、centrin 2、centrin 3 の 3 つのパラログが存在する。Centrin 1 の発現は精巢及び、網膜に限定されるのに対し、centrin 2 及び、centrin 3 は普遍的に発現している。細胞内において centrin 2 は中心体に局在することが知られている。中心体は直交する一対の中心小体と中心小体周辺物質からなる細胞内小器官であり、centrin 2 は中心小体の遠位内腔及び、中心体周辺物質に局在し、中心体複製に必須の蛋白質であることが示されている。しかしながら、centrin 2 による中心体複製制御の分子機構の詳細は不明である。

近年になり、中心体の異常、特に中心体の異数性が細胞の癌化を誘発する可能性が報告されている。さらに、組換え修復に関わる因子が中心体複製に関与することから、DNA 修復と中心体複製の関係が注目されている。

Centrin 2 は XPC 複合体の *in vitro* における損傷認識能及び、無細胞 NER 反応系の再構成のいずれにおいても必須ではなく、その NER における機能の詳細はこれまで不明であった。一方、中心体複製に必須の因子である centrin 2 が XPC 複合体に含まれることの生物学的意義の解明は非常に興味深い問題である。本研究では、NER 反応における centrin 2 の機能を明らかにすることを目的として、*in vitro*、*in vivo* の両面から解析を行った。

*In vivo* における紫外線照射時の centrin 2 の挙動を検討するために、XPC を欠損した患者由来の細胞を親株として、FLAG タグを融合した XPC を安定に発現する細胞株を樹立した。親株及び、形質転換細胞のそれぞれについて紫外線照射の前後で細胞抽出液を調製し、免疫沈降法により XPC 複合体に含まれる centrin 2 の挙動を検討した。紫外線照射の有無に関わらず、centrin 2 は XPC と複合体を形成しており、DNA 損傷にตอบสนองして XPC 複合体に含まれるのではないことが示唆された。また、XPC を欠損している親株においても centrin 2 は発現しており、その発現は XPC に非依存的であることが明らかになった。

続いて XPC 複合体における centrin 2 の機能を明らかにするために、XPC における centrin 2 との相互作用部位を同定した。Centrin 2 はカルモジュリン蛋白質ファミリーに属し、このファミリーに属する蛋白質の多くは標的蛋白質の  $\alpha$ -ヘリックスと相互作用する例が多く知られている。そこで、二次構造予測に基づき、 $\alpha$ -ヘリックスを指標にした様々な欠失変異 XPC を作製し、免疫沈降により centrin 2 との結合能を検討した。その結果、XPC における centrin 2 結合領域を 847 番目のアミノ酸から 866 番目のアミノ酸からなる領域と同定した。さらに、カルモジュリンファミリー蛋白質と標的蛋白質の相互作用は疎水性相互作用である報告が多数なされていることに加えて、XPC 複合体の精製過程に高塩濃度の溶出条件が含まれるにも関わらず、XPC は centrin 2 と安定な複合体を形成していることから、XPC と centrin 2 の相互作用も疎水性相互作用であると予測した。XPC における centrin 2 結合領域をヘリカルホイール状にプロットしたところ、二つの疎水性表面の存在が示唆された。これらの疎水性表面を形成するアミノ酸をアラニンに置換することにより、centrin 2 との相互作用に重要なアミノ酸を同定し、centrin 2 との結合能を欠失した変異 XPC (centrin 2-binding mutant; CBM) の作製に成功した。

*In vivo* において centrin 2 の機能を解析するために、内在性の XPC を欠失している XP-C 群患者細胞を親株として、XPC (CBM) を安定に、内在性の XPC と同程度に発現する細胞株を樹立した。この形質転換細胞株では、野生型 XPC を発現する細胞に比較して、(6-4) 光産物の除去効率が有意に低下していた。これは centrin 2 は NER に必須の因子ではないという従来の報告と合致する一方、*in vivo* において NER に対し、centrin 2 が何らかの促進的な効果を持つ可能性を示唆している。Centrin 2 の NER における機能を直接的に解析する為に、精製蛋白質を用いた無細胞 NER 反応を行った。野生型 XPC-HR23B 複合体を用いた場合、従来の報告と一致して損傷の切り出しが認められ、さらに、centrin 2 の添加により損傷の切り出しは劇的に促進された。一方、XPC (CBM)-HR23B 複合体を用いた場合、野生型 XPC と同様に centrin 2 の非存在下でも損傷の切り出しは行われるものの、centrin 2 の存在下においても野生型 XPC で見られたような NER 反応の増強は認められなかった。

Centrin 2 による NER 反応の促進機構をより詳細に解析する為に、XPC 複合体の損傷 DNA 結合に対する centrin 2 の効果を electrophoretic mobility shift assay により検討した。野生型 XPC-HR23B 複合体及び、XPC (CBM)-HR23B 複合体は共に損傷 DNA に特異的な結合を示した。しかしながら、centrin 2 の存在下で損傷 DNA 及び、非損傷 DNA に対する野生型 XPC 複合体の結合活性が増強されたのに対し、XPC (CBM) 複合体では促進効果は認められなかった。また、定量的な解析の結果から、centrin 2 の添加によって野生型 XPC の非損傷 DNA に対する結合が約 4 倍促進されたのに対して、(6-4) 光産物を含む DNA に対する促進は約 20 倍であることが明らかになった。

本研究により centrin 2 は XPC と安定な複合体を形成していることが示唆された。さらに、centrin 2 は XPC との複合体形成を介して、XPC の DNA 結合能を増強することにより NER に促進的に機能していることが明らかにされた。また、定量的な解析から XPC の DNA 結合は centrin 2 により、非損傷 DNA に比較して損傷 DNA に対してより効果的に促進されることが明らかになった。このことは、centrin 2 は単純に XPC の DNA に対する結合活性を促進させるだけでなく、XPC の損傷 DNA に対する結合の特異性を上昇させることにより、NER に寄与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

ゲノム全体を対象としたヌクレオチド除去修復 (GG-NER) における DNA 損傷の認識に関わる C 群色素性乾皮症の原因遺伝子産物 XPC は、出芽酵母 Rad23 の哺乳類ホモログ (HR23A もしくは HR23B) および中心体タンパク質として知られる centrin 2 (Cen2) を含むヘテロ三量体として存在する。Cen2 は、比較的最近になって新たに XPC 複合体に含まれることが明らかになったタンパク質であり、NER におけるその生化学的な機能はこれまでほとんど明らかになっていなかった。本研究では、その点について *in vivo* および *in vitro* の両面から解析を行った。

- 1) Cen2 がカルモジュリンタンパク質ファミリーに属することから、標的タンパク質の  $\alpha$ ヘリックスと相互作用する可能性を考え、XPC タンパク質の二次構造予測を行い、それに基づいて様々な欠失変異体を作成し、免疫沈降により Cen2 との結合部位を決定した。
- 2) 決定した領域 (847-866 番目のアミノ酸) に存在する疎水性表面を形成するアミノ酸をアラニン置換し、Cen2 との結合に重要なアミノ酸を同定、Cen2 との結合能を欠いた変異 XPC (Cen2-binding mutant; CBM) の作成に成功した。
- 3) XP-C 細胞に XPC (CBM) を安定に発現する細胞を樹立したところ、野生型 XPC を発現する細胞に比較して、紫外線損傷 (6-4 光産物) の除去効率が有意に低下していた。
- 4) 精製タンパク質を用いた無細胞 NER 反応において、野生型 XPC-HR23B 複合体に Cen2 を加えたところ、損傷の切り出しが劇的に促進された。一方、XPC (CBM) を含む複合体の場合は、Cen2 の添加による促進効果は見られなかった。
- 5) Cen2 は、野生型 XPC-HR23B 複合体の損傷 DNA 結合活性を促進した。

以上のように、本論文はヌクレオチド除去修復における Cen2 の機能につい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。